

ANNALES DE L'INSTITUT PASTEUR

PUBLIÉES PAR

LA DIRECTION DE L'INSTITUT PASTEUR

Avec le concours des Chefs de Service
et des Chefs de Laboratoire

Secrétaire général : P. LÉPINE



MASSON ET C^{IE}, ÉDITEURS

Libraires de l'Académie de Médecine
120, Boulevard Saint-Germain

PARIS

- Supériorité pratique de la diamino-diphényl-sulfone (1358 F) sur les sulfones disubstituées dans le traitement de la lèpre, par H. FLOCH et P. DESTOMBES
- Relation entre l'intensité de l'irisation présentée par certaines colonies de *Salmonella* et leur constitution antigénique, par P. NICOLLE, A. JUDE et L. LE MINOR
- Salmonelles et salmonelloses à Madagascar de décembre 1946 à mai 1949, par R. NEEL, J. GRABAR et L. LE MINOR
- La taille des germes composant le vaccin BCG d'après le milieu d'entretien; son importance pour le dosage du vaccin, par F. VAN DEINSE et F. MACHOLDA
- Antibiotiques actifs, *in vitro*, à des dilutions quasi homéopathiques (acides gras de l'huile de foie de morue, formes hyperactives du P. A. S. et de la streptomycine), par J. SOLOMIDÈS
- Des conditions d'action des substances dites « superficiellement actives » sur les micro-organismes, par D. G. DERVICHIAN
- Croissance et respiration d'une souche streptomycino-exigeante de *Bacillus cereus* privée de l'antibiotique-facteur de croissance, par PIERRE SCHAEFFER
- Étude biologique des staphylocoques d'origine animale, par J. PILLET, S. ISBIR et P. MERCIER
- Étude sur le mécanisme de la fermentation acéto-butylique. — III. Formation de butyrate à partir de β -hydroxybutyrate et d'acétylacétate, par GERMAINE COHEN-BAZIRE et GEORGES N. COHEN
- La réaction de Hirst appliquée à la recherche des anticorps dans la maladie de Newcastle, par GEORGETTE CORDIER, JEAN CLAVIERAS et AZIZ OUNAÏS
- Société française de microbiologie (Sommaire page 4 de la couverture)

- Œuvres de Pasteur** réunies par PASTEUR VALLERY-RADOT, tome « Mélanges scientifiques et littéraires. Index analytique de l'œuvre Pasteur ». Un vol. gr. in-8° de 666 pages. Masson et C^{ie}, édit., Paris, 1939.
- Albert Calmette. Sa vie. Son œuvre scientifique**, par P.-NOËL BERNARD et LÉOPOLD NEGRE. *Préface de Pasteur Vallery-Radot. Avant-propos de A. Yersin*. Un vol. de 274 pages. Masson et C^{ie}, édit., Paris, 1939.
- J. BORDET. — **Traité de l'immunité dans les maladies infectieuses**. Deuxième édit. Un volume de 880 pages. Masson et C^{ie}, édit., Paris, 1939.
- ANDRÉ-R. PREVOT. — **Manuel de classification et de détermination de bactéries anaérobies**. Un volume in-8° de 290 pages, 2^e édition (*Monographie de l'Institut Pasteur*), Masson et C^{ie}, édit., Paris, 1948.
- MARGUERITE LWOFF. — **Recherches sur le pouvoir de synthèse de flagellés trypanosomides**. Un vol. de 244 pages (*Monographie de l'Institut Pasteur*). Masson et C^{ie}, édit., Paris, 1941.
- EDM. SERGENT, A. DONATIEN, L. PARROT et F. LESTOQUARD (*in memoriam*). — **Études sur les piroplasmoses bovines**. Un vol. in-16 816 pages, 325 illustrations, 1945 (*Institut Pasteur, Alger*).

N. B. — Le paiement est accepté en toutes monnaies étrangères au cours du dollar au moment du règlement.

PRIX DE L'ABONNEMENT POUR 1950

France et Union Française	Fr. 2.000
(Règlement par mandat, chèques postaux [Compte n° 599 Paris] ou chèque bancaire.)	
Belgique et Luxembourg	Fr. B. 375
Autres pays	\$ U. S. A. 7

Prix également payables dans les autres monnaies au cours des règlements commerciaux le jour du paiement.

(Règlement par Banque Nationale.)

Changement d'adresse : 20 fr.

Secrétariat, 25, rue du Docteur-Roux, Paris (XV^e).

Publication mensuelle.

NOUVELLE CHIMIOTHÉRAPIE

DES

**TRYPANOSOMIASES
ET LEISHMANIOSES**

LOMIDINE

(DIMÉTHANESULFONATE DE P-P' DIAMIDINO-1-5-DIPHÉNOXY-PENTANE)

AMPOULES DE 5 CM³

DE SOLUTION CONTENANT 125 mg DE BASE

(BOITES DE 5)

TRAITEMENT

DES

MYÉLOMES MULTIPLES

ECHANTILLONS ET LITTÉRATURE SUR DEMANDE

SOCIÉTÉ PARISIENNE
D'EXPANSION CHIMIQUE

MARKES



INFORMATION MÉDICALE
28, COURS ALBERT-1^{er} - TEL. BAL. 10-70

Ancienne Maison WIESNEGG (1831-1892)
» » P. LEQUEUX (1892-1918)
» » R. LEQUEUX (1918-1948)

Ét^s LEQUEUX

S. A. R. L.

64, Rue Gay-Lussac - PARIS-5°

Télégr. : Wiesnegg-Paris-38 Tél. : OBÉON 06-25
R. C. Seine 340.141 B

**AUTOCLAVES
ALAMBICS
ÉTUVES - BAINS-MARIE
FOURS - BRULEURS**

**Matériels de :
STÉRILISATION
DÉSINFECTION
TRAITEMENT DU LAIT**

APPAREILS SPÉCIAUX SUIVANT PLANS

**MANUFACTURE DE GRILLAGES ET TOLERIE
CAGES POUR ÉTUDES BACTÉRIOLOGIQUES**

**SOCIÉTÉ DES
ÉTABLISSEMENTS**

PIARRETTE

**FONDÉS
EN 1905**

Société à Responsabilité Limitée au Capital de 300.000 Francs

SERVICE COMMERCIAL : 17, RUE DES GRANDS-AUGUSTINS, PARIS-6°

C. G. Postaux : Paris 1361-76

TÉL. : DANTON 97-75

Reg. Com. Seine 291.124 B

Fournisseur de l'Institut Pasteur et de la Faculté de Médecine.

FILTRE CHAMBERLAND SYSTÈME PASTEUR

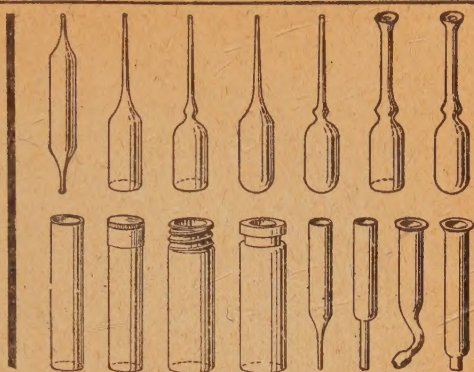
80 BIS, RUE DUTOT - PARIS-XV° VAUGIRARD 26-53

**LE SEUL FILTRE MIS AU POINT DANS LE LABORATOIRE DE PASTEUR
ET AUTORISÉ PAR LUI A PORTER SON NOM**

STÉRILISATION A FROID
APPLICATION PARTICULIÈRE A L'ÉPURATION DES EAUX
BOUGIES SPÉCIALES POUR L'USAGE DU LABORATOIRE

Verre Vitrification

5, Rue de Crimée
PARIS-XIX^e



MACHINES A IMPRIMER

OYONNAX -  - FRANCE

10, Boulevard Dupuy — Tél. 3-55

MACHINES SPÉCIALES POUR L'IMPRESSION
DES AMPOULES ET DES FLACONS

CATALOGUE SUR DEMANDE

Représentant : R. CHAMOUSSET, 8, rue Nicolas-Charlet, PARIS-XV.

FOURNITURES POUR LABORATOIRES

Verre ordinaire, Bohème, Pyrex
Verrerie soufflée et graduée
Aérométrie. Densimétrie

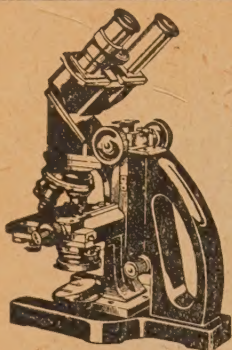
VERRERIE GÉNÉRALE

Thermométrie — Porcelaine
Papiers à filtrer - Caoutchouc
Appareillage

TOUTES PIÈCES SUR CROQUIS

CHOLIN & C^{IE} 39-41 RUE DES CLOYS, PARIS (18^e)
Tél.: Montmartre 61-81

Catalogue Général sur demande



MAISON VERICK-STIASSNIE

STIASSNIE FRÈRES

Constructeurs

67, Boulevard Auguste-Blanqui, 67

PARIS

MICROSCOPES

MICROTOMES

PEPTONE DEFRESNE

Pour PRÉPARATIONS PHYSIOLOGIQUES

Employée par l'Institut Pasteur

LABORATOIRE VAILLANT-DEFRESNE

— 77, rue Falguière — PARIS (15^e) —

CRÉSYL-JEYES

DÉSINFECTANT ANTISEPTIQUE

EMPLOYEZ LE " JEYES "

Produit très imité, jamais égalé. Action rapide et constante

La PUISSANCE ANTISEPTIQUE du CRÉSYL-JEYES est DIX FOIS plus grande
que celle du Crésylol à 50 % de Crésol.

FABRICATION SPÉCIALE ET EXCLUSIVE RÉFÉRENCES ET PRIX SPÉCIAUX AUX ADMINISTRATIONS

PRODUITS SANITAIRES ET ANTISEPTIQUES

48, Rue Charles-Bassée, FONTENAY-SOUS-BOIS (Seine) Tél. : TREMBLAY 05-17

ANNALES

DE

L'INSTITUT PASTEUR

SUPÉRIORITÉ PRATIQUE DE LA DIAMINO-DIPHENYL-SULFONE (1358 F) SUR LES SULFONES DISUBSTITUÉES DANS LE TRAITEMENT DE LA LÈPRE

par H. FLOCH et P. DESTOMBES.

(Institut Pasteur de la Guyane française, Cayenne.)

I. — SULFONES ET LÈPRE.

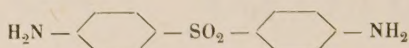
Depuis bientôt trois ans, deux dérivés sulfonés, la Promine et le Diasone, sont employés en Guyane française et nous donnent de très bons résultats, notamment dans la thérapeutique jusqu'ici fort décevante des formes lépromateuses de la lèpre [1] ; ces résultats ont d'ailleurs été obtenus par tous ceux qui, avant nous, ont utilisé cette médication. Notre conclusion générale, plus que jamais, est que les sulfones sont bien plus actives dans la lèpre que l'huile de chaulmoogra qui l'était, au maximum, fort peu.

Cependant Faget lui-même disait bien que Promine, Diasone et Promizole n'étaient pas des « spécifiques » de la lèpre : pour lui, une voie nouvelle, pleine de promesses, était ouverte ; c'est bien ainsi que nous avons nous-mêmes toujours considéré la question et récemment nous écrivions à ce sujet : « Les recherches dans cette voie sont à poursuivre ; des produits plus actifs, moins coûteux, moins toxiques, et d'application aisée doivent être découverts » [2].

Les sulfones, en effet, agissent lentement, leur mode d'admi-

nistration n'est pas commode, au moins dans le cas particulier de la Promine (injection intraveineuse quotidienne pendant des années) et leur prix de revient est très élevé.

Il était particulièrement intéressant d'étudier l'activité possible de la diamino-diphényl-sulfone dans la lèpre. Il est vraisemblable, en effet, que les grosses molécules de la Promine, du Diasone et du Sulphétrone (seul le Promizole, isomère du Sulfathiazol, ne peut libérer de sulfone-mère par simple scission) ne sont actives que grâce à leur noyau commun, la diamino-diphényl-sulfone :



Cette sulfone-mère (S. M.) a été synthétisée par E. Fromm et J. Witmann en 1908. C'est, d'une part, Fourneau, Tréfouël, M^{me} Tréfouël, Nitti et Bovet [3], et, d'autre part, Buttle et ses collaborateurs [4] qui ont montré que ce corps était très actif vis-à-vis des Streptocoques et des Pneumocoques. N. Rist, ensuite [5], montra que la sulfone-mère empêchait *in vitro* la multiplication des bacilles tuberculeux humains, bovins et aviaires et qu'elle empêchait le bacille tuberculeux aviaire de se développer chez des lapins qui en avaient reçu une dose massive [6]. Depuis lors, le même auteur a recommandé (en signalant les bons résultats que l'on peut en obtenir) l'emploi de la S. M. en traitement local dans les ulcères tuberculeux de la peau ou des muqueuses, les fistules, les abcès, les pleurésies purulentes [7]; pour lui, les sulfones disubstitués ne sont actives que par la sulfone-mère libérée de leur molécule [8].

Les sulfones disubstitués sont bien moins actives *in vitro* que la sulfone-mère et, *in vivo*, il paraît aussi que l'activité de ces différents composés varie parallèlement à leur toxicité, c'est-à-dire vraisemblablement à la quantité de diamino-diphényl-sulfone libérée.

Il est remarquable, par exemple, que la Promine soit bien moins toxique par la voie veineuse que par la voie buccale qui libère beaucoup plus de sulfone-mère. Or, la Promine est, aussi, bien plus active expérimentalement *per os* qu'en injection (9).

D'autre part, s'il peut paraître sans grande importance d'imposer à un organisme pendant quelques jours seulement l'élimination quotidienne de 6 g. (cas du sulphétrone par exemple) d'un corps chimique étranger, il n'en est peut-être pas de même lorsqu'il s'agit de malades devant être traités chaque jour pendant des années comme le sont les lépreux.

Les grandes quantités de sulfones disubstitués prescrites dans la lèpre ont un autre inconvénient majeur (puisque'il a pu être considéré comme le principal obstacle à l'extension de la thérapeutique sulfonée dans beaucoup de pays à forte endémicité

lèpreuse, pays en général économiquement pauvres) ; cet inconvénient est le prix de revient très élevé du traitement sulfoné. Il est évident qu'à ce point de vue, la sulfone-mère présente un grand intérêt puisque, nous le verrons, nous considérons actuellement que pour une année de trois cents jours de traitement effectif (interruptions déduites) : 60 g. de diamino-diphényl-sulfone (200 mg. par jour) agissent comme 1 kg. 500 de Promine (5 g. par jour), 1 kg. 800 de Promizole et de Sulphétrone (6 g. par jour), 300 g. de Diasone (1 g. par jour).

De plus, l'administration de sulfone-mère (*per os* ou en injection) permet d'obtenir une concentration sanguine plus constante en produit actif que ne le permet toute autre sulfone déjà employée en thérapeutique antilèpreuse.

En effet, la libération de la diamino-diphényl-sulfone dans l'organisme à partir de ces sulfones composées est soumise à bien des facteurs individuels ou passagers qui la rendent irrégulière.

Lorsqu'on dose la sulfone-mère (dans le sérum ou dans les urines) chez des malades absorbant ce produit lui-même, on sait à quoi correspondent les chiffres obtenus ; il n'en est pas de même en général lorsque le malade est traité à l'aide de sulfones disubstituées : quelle est la part qui revient à la diamino-diphényl-sulfone active et celle qui revient à la sulfone composée dans ces cas ? Il convient d'ailleurs de remarquer que la Promine est relativement instable en solution aqueuse, libérant alors la sulfone-mère, accroissant ainsi, mais dans des proportions imprévisibles, son taux bactériostatique (diversement apprécié, de 1 à 3,3, de ce fait, suivant les auteurs) en même temps que sa toxicité.

II. — ACTION THÉRAPEUTIQUE

DE LA DIAMINO-DIPHÉNYL-SULFONE DANS LA LÈPRE.

PRÉSENTATION. — Nous avons utilisé la sulfone-mère par la voie buccale (en comprimés) et par la voie intramusculaire (1).

Les comprimés sont dosés à 10 et 20 mg. de diamino-diphényl-sulfone. Les premiers conviennent aux enfants et aux adultes au début du traitement ; les seconds sont préférables lorsque les fortes doses sont atteintes. En fait, les comprimés à 20 mg. peuvent facilement être administrés dès le début du traitement et sont les plus pratiques.

La sulfone injectable est présentée sous la forme de *suspension* en eau physiologique et subtosan à deux concentrations : au 1/20 et au 1/10. L'usage nous a aussi montré que la suspension concentrée pouvait être employée dès le début du traitement.

(1) Nous tenons à remercier la maison Théraplix qui a aimablement mis à notre disposition les produits nécessaires à notre étude.

POSOLOGIE. — Nous avons, au début, été prudents dans la progression des doses quotidiennes, commençant chez l'adulte, par 40 mg. (voie buccale) chaque jour en quatre reprises et n'augmentant que de 20 mg. par semaine. Mais nous nous sommes vite rendu compte que, d'une part, la progression pouvait être bien plus rapide, et que, d'autre part, la dose journalière pouvait être absorbée en trois prises à chacun des trois repas, la plus importante le soir. De même, pour la sulfone-mère injectable nous avons pu, devant la bonne tolérance du médicament, activer la progression des doses.

En règle générale, nos malades ont été traités six jours de la semaine sur sept et ont eu une semaine de repos thérapeutique après deux mois de traitement.

Ces interruptions hebdomadaires et bimensuelles semblent sans grand risque au point de vue développement d'une chimio-résistance chez les bacilles de Hansen soumis à l'action sulfonée. En effet, l'élimination urinaire de la sulfone-mère (étudiée avec le concours du Pharmacien Commandant Deniel) chez plusieurs malades recevant quotidiennement par la voie buccale 200 mg. de diamino-diphényl-sulfone, est en moyenne de 161 mg. par jour (80 p. 100) ; après interruption on note une élimination de 110 mg. le premier jour, cette élimination se poursuivant en décroissant jusqu'au septième jour où on retrouve encore dans les urines des traces de sulfone-mère.

Nous appliquons maintenant, en règle générale, le schéma thérapeutique suivant chez l'adulte au début de la mise en œuvre de traitement par la diamino-diphényl-sulfone :

	SULFONE-MÈRE Comprimés à 20 mg. par jour					SULFONE-MÈRE injectable au 1/10 par jour	
	Matin	Midi	Soir	Total (comp.)	Total (mg.)	cm ³	mg.
1 ^{re} semaine	1	1	1	3	60	0,5	50
2 ^e semaine	2	1	2	5	100	1	100
3 ^e semaine	2	2	3	7	140	1,5	150
4 ^e semaine	3	2	4	9	180	1,75	175
5 ^e semaine	3	3	4	10	200	2	200

Chez les enfants, nous suivons une progression parallèle mais aboutissant évidemment à des doses plus faibles et qui sont en général de 70 mg. de cinq à six ans, 100 mg. de sept à dix ans, 150 mg. de onze à quinze ans.

Ce schéma thérapeutique n'a rien d'absolu ; tel quel il est bien

supporté et la dose quotidienne de 200 mg. atteinte est active, aussi peut-il être employé d'emblée et c'est celui que nous conseillons à ceux qui commenceraient à utiliser la sulfone-mère dans la lèpre.

Nous continuons d'ailleurs à le modifier, surtout dans le sens d'une augmentation de la dose maxima que nous n'avons pas atteinte. C'est ainsi que plusieurs de nos malades supportent remarquablement, *per os*, la dose quotidienne de 260 mg. Avec la sulfone injectable nous n'avons pas non plus atteint la dose maxima tolérée ; certains malades prennent 250 mg. quotidiennement et nous administrons maintenant à la plupart d'entre eux 400 mg. tous les deux jours. L'élimination urinaire indique que l'absorption de la sulfone-mère injectée dans le muscle est suffisamment lente pour permettre cette dernière posologie, qui est évidemment fort pratique et représente un grand progrès dans la thérapeutique sulfonée ; nous avons même quelques malades qui reçoivent deux injections par semaine, de 600 mg. de sulfone-mère chacune. Cochrane injecte chaque semaine 2,50 g. de sulfone-mère en suspension dans l'huile d'arachide mais avec manifestations toxiques [40].

Nous tenons aussi à souligner que les repos hebdomadaires et bimensuels ne sont pas obligatoires et nous avons des malades qui ont été traités quatre mois durant, sans un jour d'arrêt et sans plus de manifestations toxiques que ceux chez qui l'administration de la sulfone-mère était interrompue.

Les doses totales atteintes chez nos malades ambulatoires, traités depuis six à sept mois, oscillent entre 20 et 30 g., mais nos malades couchés en ont reçu en quatre mois 22 g.

EXAMENS DE CONTRÔLE ET SURVEILLANCE. — Comme nous l'avons fait pour la Promine et le Diasone, des examens réguliers ont été pratiqués sur nos malades pour suivre l'état de leur sang (numération globulaire, taux d'hémoglobine, formule leucocytaire) afin de traiter, le cas échéant, les anémies, puisque c'est la seule manifestation toxique du produit que nous ayons constatée comme avec les diverses sulfones.

Les urines ont été régulièrement contrôlées pour dépister des lésions rénales possibles.

L'examen du mucus nasal des lépromateux permet de rechercher les éventuelles modifications du nombre et de la morphologie des bacilles.

Des biopsies ont été pratiquées avant et au cours du traitement.

RÉSULTATS STATISTIQUES. — Depuis novembre 1948, 101 malades au total ont été mis au traitement par la sulfone-mère : 80 d'entre eux par la voie buccale et 21 par la voie intramusculaire.

Comme nous l'avons déjà fait avec la Promine et le Diasone, nous avons tenu à mettre en traitement, à côté des malades lépromateux, d'autres malades atteints de forme indifférenciée et de forme tuberculoïde. Le tableau suivant renseigne sur ce sujet comme sur la durée des traitements au 15 juillet 1949.

Pour pouvoir comparer l'activité de la sulfone-mère à celle de la Promine et du Diasone, nous envisagerons, en premier lieu, les résultats obtenus chez les malades lépromateux (que nous n'avons pas spécialement sélectionnés et dont les lésions étaient souvent très avancées ; nous tenons à le signaler parce que les résultats du traitement sulfoné sont plus rapidement favorables lorsqu'il s'agit de lépromateux récents).

DURÉE des traitements	FORME lépromateuse		FORME indifférenciée		FORME tuberculoïde		TOTAUX	
	S.M. comp.	S.M. inj.	S.M. comp.	S.M. inj.	S.M. comp.	S.M. inj.	S.M. comp.	S.M. inj.
7 mois	6		2				8	
6 mois	2		1	1	13	1	16	2
5 mois	2	6	6	5	2	2	10	13
4 mois	22	3	3		3		28	3
3 mois	3	2	1			1	4	3
Moins de 3 mois. . .	6		4		4		14	
Totaux	41	11	17	6	22	4	80	21
	52		23		26		101	

Le tableau suivant résume nos constatations ; nous n'y prenons pas en considération les malades dont la durée du traitement est inférieure à trois mois. Tous n'ont, en général, reçu préalablement, sans succès, qu'un traitement fort irrégulier à base d'huile de chaulmoogra.

SULFONE-MÈRE	MALADES traités	MALADES AMÉLIORÉS		MALADES stationnaires	MALADES aggravés
		Nombre	p. 109		
En comprimés. . .	35	26	74	8	1
Injectable	11	10	94		1
Au total	46	36	78	8	2

Cliniquement nous constatons que, pratiquement, la sulfone-mère agit de façon sensiblement égale quelle que soit la voie d'introduction ; ainsi nous pouvons considérer comme indice de l'activité de la sulfone-mère le pourcentage général d'amélioration de 78.

Ce pourcentage est, au moins, analogue à celui que nous avons enregistré à l'aide de la Promine et du Diasone après la même durée de traitement. Il ne le cède en rien à ceux obtenus par les auteurs appliquant le traitement sulfoné. Faget [11] écrivait que « les améliorations nettes, objectives, en règle générale, se manifestent rarement avant six mois de traitement » (il s'agit des résultats obtenus à l'aide de la Promine, du Diasone et du Promizole). Cependant il faut ajouter que le même auteur, avec Pogge [12], obtint 25,6 p. 100 d'améliorations sur 38 malades traités moins de six mois à la Promine et 68,7 p. 100 d'améliorations chez d'autres malades après trois et six mois de traitement au Diasone [13]. Par ailleurs, Davey a obtenu 15 améliorations (88 p. 100) après cinq mois et demi à dix mois de traitement (nettement plus prolongé que le nôtre par conséquent) sur 17 malades traités par le Sulphétrone [14].

Il est donc évident que la sulfone-mère nous donne des résultats statistiques cliniques au moins comparables à ceux donnés jusqu'ici par la Promine, le Diasone, le Promizole et le Sulphétrone dans le traitement des formes lépromateuses de la lèpre.

Ajoutons que nous n'avons pas observé de différences notables dans l'action de la sulfone-mère en relation avec la race de nos malades qui, à ce point de vue, se répartissent comme suit :

	CRÉOLES	CHINOIS	ARABES	EUROPÉENS	TOTAUX
SM. comprimés. . .	64	3	5	8	80
SM. injectable . . .	19	1		1	21
Totaux	83	4	5	9	101

RÉSULTATS CLINIQUES. — Comme avec les autres sulfones, nous avons enregistré les résultats les plus favorables dans les formes lépromateuses.

Les premiers signes d'amélioration ont porté sur les lésions muqueuses (rhinite en particulier) : la gêne respiratoire diminue progressivement, les épistaxis s'espacent et disparaissent.

Après deux à trois mois de traitement, on assiste souvent à la désinfiltration des lépromes et des nappes lépromateuses, les lésions s'affaissent, la peau se ride, desquame quelquefois et on note une pigmentation cutanée ardoisée caractéristique à leur

niveau. Cette fonte des lésions lépromateuses est souvent spectaculaire. Les lépromes qui paraissent régresser le plus lentement sont ceux situés aux ailes du nez et aux oreilles.

Les troubles trophiques des membres sont souvent améliorés, l'œdème des extrémités diminue ou disparaît, les ulcérations, y compris les ulcères plantaires, se cicatrisent fréquemment et rapidement.

L'action sur les névrites, par contre, est irrégulière. Nous avons cependant quelques observations favorables, notamment celle d'un malade qui, alité depuis quelques années, s'est tellement amélioré après deux mois de traitement qu'il peut désormais sortir de chez lui.

L'état général des malades est fréquemment amélioré : reprise de l'appétit et du poids, regain des forces.

Evidemment leur psychisme est excellent, les améliorations manifestes les frappent et les vieux lépromateux, lassés de l'huile de chaulmoogra et de toutes les tentatives thérapeutiques malheureuses antérieures, reprennent espoir.

Il est intéressant de signaler que l'amélioration peut apparaître relativement rapidement après le début du traitement. C'est ainsi, à titre d'exemple, que chez nos 36 malades améliorés, les modifications favorables franches se sont manifestées :

Au cours du deuxième mois de traitement	3 fois.
Au cours du troisième mois	45 —
Au cours du quatrième mois	17 —
Au cours du sixième mois	4 —

Dans les formes tuberculoïdes et indifférenciées, la sulfonamide agit, dans les limites de temps que nous envisageons, exactement comme les sulfones disubstitués ; l'action est bien moins rapide et bien moins spectaculaire que dans les formes lépromateuses ; il est souvent difficile de faire la part, dans ces cas, de ce qui revient à l'évolution spontanée de l'affection ; nous sommes d'ailleurs persuadés que l'action médicamenteuse est encore efficace dans ces cas ; cette question est de première importance pour la prophylaxie de la lèpre en pays endémique, aussi mérite-t-elle une étude spéciale.

QUELQUES OBSERVATIONS CLINIQUES. — Parmi nos améliorations cliniques nous ne résumons rapidement que celles de 5 malades qui ont bénéficié d'améliorations manifestes, spectaculaires même. Tous nos malades améliorés ne le sont pas évidemment à un tel degré, mais chez tous, les modifications cliniques sont frappantes.

OBSERVATION I. — A. B. K., Arabe de cinquante-quatre ans, présente une forme lépromateuse datant de six ans : infiltration profonde diffuse

brunâtre du visage, nez épaté et bourgeonnant, oreilles en chou-fleur, infiltration moins accusée des mains et des avant-bras, doigts légèrement boudinés avec quelques ulcérations, membres inférieurs infiltrés.

Pas de traitement sulfoné antérieur.

En trois mois et demi il reçoit 11,760 g. de sulfone-mère *per os*.

L'amélioration commence à se manifester à la fin du deuxième mois : après trois mois et demi les nodules de la face ont complètement disparu, les lobes des oreilles sont désinfiltrés et flétris, les téguments du visage ont pris, au niveau des anciens lépromes, une teinte grisâtre typique, la peau des membres supérieurs et des membres inférieurs est ridée et désinfiltrée, les plaies des doigts sont cicatrisées. Traitement bien supporté.

OBS. II. — R. H., Arabe de quarante-sept ans, atteint d'une forme lépromateuse depuis cinq ans : visage infiltré en nappe dans son ensemble, énormes lépromes du front et des oreilles, nappe infiltrée du tronc et des bras, petits lépromes du coude, névrite cubitale avec griffe, importants troubles trophiques des membres inférieurs avec aspect « en peau de crocodile », rhinite et kérato-conjonctivite.

Pas de traitement sulfoné antérieur.

Le malade reçoit 12 g. de sulfone-mère en trois mois. On constate alors une désinfiltration complète du visage et des membres mais peu de changement du côté des oreilles ; la guérison de la rhinite et de la kérato-conjonctivite est obtenue. L'amélioration a commencé au deuxième mois sur les symptômes de rhinite.

OBS. III. — L. A., Créole guyanaise de vingt-trois ans, présente une forme lépromateuse datant de trois ans : nombreux lépromes du visage, ceux des oreilles sont ulcérés ; névrites cubitales avec griffes et amputation des phalangettes, jambes éléphantiasiques avec ulcères.

Pas de traitement sulfoné antérieur.

En six mois (fin juin 1949), la malade a reçu 20 g. de sulfone-mère *per os*. La tolérance est parfaite, l'amélioration est notable : les lépromes sont très affaissés et les téguments sont noirs à leur niveau ; les ulcères des oreilles et des jambes sont cicatrisés ; l'état général est excellent.

OBS. IV. — E. J., Créole guyanais de seize ans, est atteint d'infantilisme (aspect d'un enfant de huit ans) ; il est lépreux depuis l'âge de cinq ans, les lésions lépromateuses sont apparues à huit ans. En mars 1949, il présente des lépromes du visage (sourcils, ailes du nez, lèvres et oreilles), des macules fauves du tronc, des névrites avec importants troubles trophiques des membres inférieurs, des ulcères au niveau des pieds. Son état général est mauvais.

Pas de traitement sulfoné antérieur.

En trois mois, il reçoit 9 g. de sulfone-mère (à la dose de 100 mg. par jour *per os* en raison de son développement corporel). Fin juin, le malade est très amélioré : les lépromes du visage sont en partie affaissés et hyperpigmentés, les ulcères sont cicatrisés. Signalons que ce malade a été traité sans un seul jour de repos, mais avec adjonction de fer. Le seul incident fut une réaction passagère focale des deux joues, ayant duré une semaine.

Obs. V. — L. J., Européen de cinquante ans, présente une forme lépromateuse récente (un an). Non encore traité, on constate, en mars 1949, une infiltration érythémateuse très marquée au niveau des arcades sourcilières ; sur le tronc et les membres on observe d'innombrables macules rosées, infiltrées (confluentes au niveau du dos) ; les membres inférieurs sont le siège d'hyperesthésies et de paresthésies (sensation permanente de marcher sur des aiguilles) et présentent de nombreux petits ulcères aux pieds.

Il est mis en traitement au milieu d'avril 1949. Fin juin, il a reçu 8 g. de sulfone-mère *per os*. On constate alors une disparition presque complète de l'infiltration des arcades sourcilières. Sur le tronc les taches sont toujours aussi nombreuses mais sont désinfiltrées et prennent une teinte jaunâtre, celles des membres prennent une teinte ocre ; la névrite est améliorée, la sensation de marcher sur des aiguilles a complètement disparu. Les ulcères des pieds sont cicatrisés.

Nous n'avons jamais enregistré de meilleurs résultats à l'aide des sulfones disubstitués.

INCIDENTS AU COURS DU TRAITEMENT. — Au cours du traitement nous avons observé les incidents suivants :

1° Une anémie isochrome avec asthénie, facilement curable par la médication ferrique (protoxalate de fer à 0,20 g. par jour). Ces anémies, auxquelles nous étions habitués avec les sulfones disubstitués, n'ont jamais revêtu de caractère de gravité.

2° Des phénomènes digestifs banaux : pesanteur gastrique, rarement nausées, très rarement vomissements ; les alcalins en viennent facilement à bout ; ces incidents sont indiscutablement, aux doses employées, plus bénins que ceux que nous avons enregistrés avec le Diasone à la dose de 1 g. par jour.

3° Une fois, des phénomènes d'intolérance à type urticarien survenant une heure après l'injection de sulfone-mère. La désensibilisation par les antihistaminiques n'ayant rien donné, le malade a été mis au traitement *per os* à doses prudemment croissantes et, jusqu'ici, le supporte sans incidents.

4° Chez nos lépromateux en traitement par les comprimés, huit fois sont apparus des phénomènes aigus de réaction léprotique (23 p. 100 des malades traités). Ces incidents sont observés par tous les auteurs utilisant les sulfones. Lauro de Souza Lima l'observe chez 40 p. 100 de ses malades et Fernandez dans 60 p. 100 des cas. Nous les avons nous-mêmes enregistrés à l'aide des dérivés disubstitués [15]. Ils sont, sans aucun doute, les témoins de l'activité du médicament, se produisent en général au cours des premiers mois de traitement, ne contre-indiquent pas en général sa continuation, s'espacent et s'atténuent avec le temps.

Il faut distinguer d'ailleurs, dans ce groupe, les réactions léprotiques vraies et les pseudo-exacerbations de la lèpre où la réaction

rappelle cliniquement et histologiquement le type tuberculoïde réactionnel et témoigne d'une modification favorable du terrain [16].

Cette question des réactions, qui ne manquent d'ailleurs pas d'être gênantes dans certains cas, est évidemment extrêmement importante et sera étudiée en détail ultérieurement.

RÉSULTATS BACTÉRIOSCOPIQUES ET HISTOLOGIQUES. — La sulfone-mère provoque dans les tissus lépromateux des modifications bactériologiques du même ordre que celles qui sont obtenues par la Promine et le Diasone [4]. Ces modifications sont quantitatives et qualitatives.

Le nombre des bacilles diminue progressivement avec la durée du traitement. Nous n'avons pas obtenu de négativation bactériologique ; ce n'est qu'après quelques années que ce résultat doit vraisemblablement pouvoir être obtenu, en règle générale, comme avec les sulfones disubstitués.

Les modifications qualitatives montrent que du stade bacillaire normal on passe aux bacilles granuleux puis aux granulations acido-alcool-résistantes isolées.

Ces résultats s'observent aussi bien sur les coupes de biopsies cutanées que dans le mucus nasal.

Cette action sur le bacille de Hansen, facilement constatable dans les lésions lépromateuses, est souvent impossible à mettre en évidence dans les formes paucibacillaires (indifférenciées ou tuberculoides). Elle n'en existe pas moins dans ces formes et ces malades bénéficient aussi, à longue échéance, du traitement sulfoné.

L'histologie des lésions lépromateuses traitées par la sulfone-mère se ramène au type de la « lésion lépromateuse en régression » de Rath de Souza et Alayon : vacuolisation intense donnant un aspect troué au niveau du granulome lépromateux. Dans ces cavités existent de rares bacilles, le plus souvent granuleux. Ces résultats histo-pathologiques sont ceux qu'on obtient à l'aide des sulfones disubstitués.

Nous avons aussi observé, dans un cas de lésion lépromateuse en régression, la formation de nombreuses cellules géantes, à noyaux épars ou même en couronne au contact des cavités vacuolaires et dont le cytoplasme acidophile était pourvu des énigmatiques « corps astéroïdes » de Villanova (« corps stellaires » de Rath de Souza).

CONCLUSIONS.

Depuis le mois de novembre 1948, nous avons employé la diamino-diphényl-sulfone (1358 F), ou « sulfone-mère », dans le traitement de 101 lépreux avec des résultats extrêmement favo-

rables, nullement inférieurs à ceux obtenus par les différents auteurs et par nous-mêmes à l'aide des sulfones complexes (Promine, Diasone, Promizole, Sulphétrone).

La sulfone-mère peut être employée par la voie buccale et par la voie intramusculaire avec une efficacité sensiblement égale dans les deux cas, pour une même dose. Ce fait n'est pas constaté avec les sulfones complexes et vient à l'appui de l'hypothèse que celles-ci n'agissent que par la diamino-diphényl-sulfone que leurs molécules libèrent.

La dose de 200 mg. par jour est active et non toxique chez les adultes par la voie buccale ; ce n'est pas là la dose maxima tolérée, plusieurs de nos malades supportent facilement 260 mg. par jour. Nous avons aussi employé cette même dose quotidienne de 200 mg. par jour en injections intramusculaires (suspension en eau physiologique et subtosan). L'insolubilité de la sulfone-mère permet une résorption lente et l'élimination urinaire est analogue chez les malades recevant 200 mg. chaque jour et chez ceux recevant 400 mg. tous les deux jours. C'est la posologie (très pratique évidemment) que nous appliquons, en règle générale, actuellement. Nous injectons même à quelques malades 600 mg. deux fois par semaine. La dose quotidienne de 200 mg. par la voie intramusculaire n'est pas non plus la dose maxima, certains de nos malades reçoivent maintenant 250 mg. chaque jour.

La sulfone-mère est directement active sur le bacille de Hansen ; elle commande la toxicité des diverses sulfones ; sa maniabilité thérapeutique est grande : les réactions toxiques se réduisent pratiquement à l'anémie habituelle (vraiment bénigne, évitable par le protosalate de fer et n'ayant jamais nécessité, chez nos malades, l'interruption du traitement) et à des troubles gastriques (voie buccale) nettement plus légers que ceux que nous avons enregistrés avec le Diasone.

La sulfone-mère étant bien plus active que les sulfones complexes (dans une année thérapeutique 60 g. de diamino-diphényl-sulfone agissent comme 300 g. de Diasone, 1,500 kg. de Promine, 1,800 kg. de Promizole ou de Sulphétrone), le prix de revient du traitement d'un lépreux est bien plus bas à l'aide de ce produit et ainsi un obstacle sérieux à l'extension du traitement sulfoné disparaît.

De plus, il peut ne pas paraître indifférent d'imposer chaque année l'élimination de quelques dizaines de grammes seulement d'un produit chimique à un organisme malade au lieu de plusieurs centaines, voire de milliers, de grammes de produits même peu toxiques apparemment.

L'intérêt de l'activité et de l'emploi de la sulfone-mère réside aussi en ce que, partant de cette molécule active, il sera aisé de

comparer la valeur des nouveaux dérivés de la diamino-diphényl-sulfone qui seront obtenus par le blocage de ces deux amines libres (ou plus logiquement d'une seule de ces amines) par une chaîne elle-même active sur le bacille de Hansen.

Pour terminer, nous dirons que la diamino-diphényl-sulfone répond aux conditions essentielles pour l'utilisation d'un produit antilépreux posées par le Congrès de la Havane :

A. Preuves directes ou indirectes de son action antibactérienne dans les maladies à mycobactéries ;

B. Possibilité d'utilisation à des doses thérapeutiques efficaces sans effets toxiques ou modifications physiologiques irréversibles ;

C. Tolérance aisée ;

D. Preuves cliniques et bactériologiques d'activité obtenues en moins de douze mois.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] FLOCH (H.) et CAMAIN (R.). *Bull. Acad. Nat. Méd.*, 1948, **132**, 606.
- [2] FLOCH (H.). Rapport sur le fonctionnement technique de l'Institut Pasteur de la Guyane. Titre IV. Lèpre. *Publication n° 188 de l'I. P. de la Guyane*, mars 1949.
- [3] FOURNEAU (E.), TRÉFOUËL (J.), NITTI (F.), BOVET (D.) et TRÉFOUËL (M^{me}). Activité antistreptococcique des dérivés sulfurés organiques. *C. R. Acad. Sci.*, 1937, **204**, 1763.
- [4] BUTTLE (G.), STEPHENSON (D.), SMITH (T.) et FOSTER (G.). *Lancet*, 1937, **1**, 133.
- [5] RIST (N.). *C. R. Soc. Biol.*, 1939, **130**, 972.
- [6] RIST (N.), BLOCH (F.) et HAMON (V.). *Ces Annales*, 1940, **64**, 203-238.
- [7] RIST (N.). *J. Suisse de Méd.*, 1948, n° 10, 224.
- [8] RIST (N.). *J. Méd. Leysin*, novembre-décembre 1945, n° 6.
- [9] FELDMAN (W. H.), HINSHAW (H. C.) et MOSES (H. E.). *Proceed. Staff Meet, Mayo Clin.*, 1940, **15**, 695.
- [10] COCHRANE (B.). *Leprosy Review*, 1949, **20**, 4.
- [11] FAGET (G. H.). *Internat. J. Leprosy*, 1947, **15**, n° 1.
- [12] FAGET (G. H.) et POGGE (R. C.). *Publ. Health Reports*, 1945, **60**, n° 40.
- [13] FAGET (G. H.) et POGGE (R.). *New Orleans Medical a. Surgical J.*, 1945, **98**, n° 4.
- [14] DAVEY. *Leprosy review*, 1947, **2**, 55.
- [15] FLOCH (H.) et CAMAIN (R.). Sur le traitement de la lèpre par les sulfones en Guyane française. *Publ. 179 de l'Institut Pasteur de la Guyane française*, septembre 1948.
- [16] SOUZA LIMA (L. DE). *Arquivos Mineiros de Leprologia*, 1948, Ano VIII, n° 1, 3.

RELATION ENTRE L'INTENSITÉ DE L'IRISATION PRÉSENTÉE PAR CERTAINES COLONIES DE *SALMONELLA* ET LEUR CONSTITUTION ANTIGÉNIQUE

par P. NICOLLE, A. JUDE et L. LE MINOR (*).

(Institut Pasteur et Laboratoire Central de Bactériologie
de l'Armée.)

L'IRISATION DES CULTURES EN COUCHE CONTINUE. — Lorsque des cultures en couche continue de certaines espèces bactériennes appartenant aux genres *Salmonella*, *Escherichia*, *Shigella*, *Proteus*, *Vibrio*, etc., dans leur forme « Smooth », sont soumises à la transillumination oblique, elles donnent souvent lieu à un phénomène remarquable de décomposition de la lumière : pour une incidence d'éclairement déterminée, l'observateur qui se déplace devant la culture voit celle-ci se teinter successivement de toutes les couleurs du spectre. Dans certains cas, une distance relativement grande devra être franchie pour passer du rouge au violet : ce sont les souches faiblement irisées. Avec d'autres, au contraire, un minime déplacement permet de parcourir toute la gamme colorée et parfois, du même point, qui peut, suivant les souches, être différemment situé, on aperçoit simultanément plusieurs couleurs.

L'intense irisation de certaines souches s'accompagne généralement d'une vive luminosité. De telles cultures présentent un aspect chatoyant qui rappelle celui des ailes de certains papillons exotiques fréquemment utilisées par l'art décoratif.

Il est des espèces bactériennes plus irisées que d'autres ; mais d'une façon générale, chez une même espèce, l'intensité de l'irisation varie considérablement d'une souche à l'autre. L'importance du phénomène semble, dans une certaine mesure, sous la dépendance des conditions de l'environnement. Cependant les différences observées entre les souches persistent, avec plus ou moins de netteté, quels que soient les changements de ces conditions.

Chaque souche possède donc un pouvoir d'irisation qui lui est propre. Le but de notre travail a été de chercher les raisons des

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 5 janvier 1950.

différences observées entre les souches d'une même espèce et de voir si le degré d'irisation ne ferait pas partie de cet ensemble de caractères qui confèrent à une souche son individualité, ou plus simplement qui définissent l'état de son évolution.

L'IRISATION DES COLONIES SÉPARÉES. — Le phénomène de décomposition de la lumière par certaines cultures en nappe continue se retrouve, avec autant de netteté et de diversité, lorsqu'on soumet à la transillumination oblique des plaques de gélose sur lesquelles les colonies séparées se sont développées.

Tout se passe comme si une colonie était constituée par une multitude de petits prismes dont l'orientation serait en majeure partie la même : vue sous une certaine incidence, la colonie tout entière présente une couleur prédominante, parfois très vive. Cette couleur sera, suivant les cas, rouge, jaune orangé, verte, bleue ou violacée ; en même temps l'intensité lumineuse ira en décroissant de la première à la dernière de ces colorations.

Certaines espèces, certaines souches d'une espèce déterminée, montrent, sur une même plaque de gélose, des colonies toutes semblables : *S. paratyphi* B, souches Vi pures de *S. typhi*, souches non Vi du même germe.

D'autres espèces, d'autres souches d'une même espèce accuseront au contraire une nette diversité d'irisation parmi les colonies cultivées sur une même plaque : souches à la fois Vi-agglutinables et O-agglutinables de *S. typhi*, certaines souches d'*Escherichia coli*.

MATÉRIEL ET TECHNIQUES. — *Cultures.* — Nos recherches ont porté principalement sur trois souches de *S. typhi* isolées de cas récents à Marseille (1) : souches J. 862, J. 876 et J. 877.

De nombreuses souches de *S. paratyphi* B, provenant toutes de cas récents et appartenant à plusieurs types bactériophagiques (types Beccles, Taunton, Dundee) ont été examinées. La souche P. 8 qui, seule parmi les para B, avait montré, tant à la transillumination oblique qu'à la détermination des types bactériophagiques, une hétérogénéité dans le comportement des isolats, a fait l'objet d'une étude plus approfondie.

Les cultures et les isollements de colonies ont été en général effectués sur milieu gélosé à 1,5 p. 100, peptoné à 2 p. 100, salé à 0,5 p. 100 (peptone Vaillant 5 B ou peptone Uclaff). Le milieu gélosé à 1 p. 100 au bouillon de digestion pepsique convient particulièrement pour la mise en évidence de l'irisation des colonies Vi de *S. typhi*.

L'examen des colonies est toujours pratiqué après dix-huit

(1) Ces souches nous ont été envoyées par le Dr Ronchèse, de Nice, auquel nous adressons nos sincères remerciements.

heures, mais jamais au delà de vingt-quatre heures d'étuve à 37° C. A cet âge, à part les différences d'irisation qui sont déjà nettes, les colonies ne montrent à l'œil nu et à la loupe que de très faibles variations d'opacité et une structure identique. Cependant, au microscope, les aspects sont déjà diversifiés.

Agglutination. — L'analyse antigénique des souches-mères et des isolats a été pratiquée par l'agglutination sur lame au moyen des sérums spécifiques.

Détermination des types bactériophagiques et recherche de la sensibilité aux phages spécifiques. — Pour *S. typhi*, nous avons employé les phages du *Central Enteric Reference Laboratory and Bureau* (Professeur A. Felix, Londres) en adoptant une variante de la méthode de Craigie (A. Jude et P. Nicolle, 1949). Pour les souches de *S. paratyphi* B, nous avons utilisé la méthode de Felix et Callow, 1943.

Examen des colonies. — La transillumination oblique consiste essentiellement à projeter sur le fond d'une boîte de gélose un faisceau lumineux divergent fourni par une lampe à lentille pour l'éclairage du microscope (modèle Nachet). Ce faisceau forme, avec le plan dans lequel la boîte est située, un angle de 25° environ.

Les cultures et les colonies sont examinées à l'œil nu ou à l'aide d'une loupe de moyen grossissement. On se déplace légèrement de haut en bas devant la boîte de manière à faire varier l'angle d'observation : lorsque la souche étudiée est homogène, toutes les colonies du secteur examiné passent ensemble par les couleurs successives du spectre. Lorsque, au contraire, la souche est hétérogène, il apparaît, parmi les colonies, des différences de coloration qui s'accusent ou s'atténuent suivant l'incidence. Avec un peu d'habitude, on trouve aisément le point favorable à la meilleure différenciation.

Un moyen commode, mais non indispensable, de pratiquer cet examen, consiste à déposer la boîte de gélose sur un petit pupitre de bois dont l'abattant vitré peut prendre et garder l'inclinaison voulue grâce à une vis filetée. Un cache circulaire en contre-plaqué, fixé au vitrage, maintient la boîte en place et en même temps protège la vue contre l'éblouissement.

Le pupitre, privé de paroi postérieure, est placé devant la lampe à lentille dont le faisceau est réglé suivant l'incidence mentionnée plus haut.

Un tel pupitre, de construction très simple, rendra en outre de nombreux services dans tout laboratoire de microbiologie. Il offre sur les « *Colonies counters* », de fabrication étrangère, d'appréciables avantages, en dehors de la modicité de son prix de revient : on peut, en combinant la lampe à lentille avec un jeu de miroirs orientables (plans et concaves), obtenir une infinie variété

d'éclairements qui permettront dans bien des cas de découvrir d'intéressants détails. Il facilite considérablement toutes les numérations de colonies microbiennes et de plages bactériophagiques. Un triple boulier lui est adjoint dans ce but pour marquer les dizaines, les centaines et les milliers ou pour numérer simultanément trois variétés de colonies ou de plages.

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX. — 1° *Hétérogénéité d'irisation chez certaines souches de S. typhi.* — La souche J. 877, isolée par hémoculture, présentait tous les caractères biochimiques de *S. typhi*. Elle était agglutinée sur lame par le sérum anti-IX et par le sérum anti-Vi : elle se présentait donc sous la forme Vi dégradée de Felix (forme VW de Kauffmann). L'épreuve de sensibilité aux phages Vi spécifiques nous a montré que cette souche appartenait au type bactériophagique E₁. Mais la zone lysée, quoique étendue à toute la surface de la culture touchée par les phages E₁ et E₂ (lyse confluyente), était, après dix-huit heures d'étuve à 37° C, comblée par une culture en nappe presque aussi épaisse que la culture environnante (lyse voilée). Cette incomplète sensibilité aux phages Vi s'expliquait par la présence dans la culture d'une proportion importante d'éléments bactériens dépourvus d'antigène Vi et, par là-même, insensibles aux phages Vi spécifiques. Il convenait, pour obtenir des résultats plus clairs avec la méthode de Craigie, de pratiquer des isolements de colonies et de rechercher, parmi celles-ci, les colonies Vi pures.

En examinant, avec le dispositif d'éclairage décrit plus haut, les plaques de géloseensemencées pour l'isolement, nous avons constaté la présence de trois sortes de colonies. Les plus nombreuses, moyennement lumineuses et faiblement irisées, avaient, pour une incidence d'observation donnée, une coloration verte, d'autres encore moins lumineuses et dépourvues d'irisation étaient bleues ; enfin, une faible proportion, 1 à 2 p. 100 environ, étaient intensément irisées et sous la même incidence apparaissaient colorées en un beau jaune d'or très brillant. Ces différents aspects se retrouvaient régulièrement à chaque isolement.

Des subcultures ont été faites à partir de ces trois variétés de colonies. Après dix-huit heures d'étuve à 37° C, elles ont été examinées sous le rapport de leur constitution antigénique et de leur sensibilité aux phages Vi : d'une façon générale, les subcultures des colonies jaunes se montraient Vi-agglutinables et O-inagglutinables (formes Vi pures de Felix, ou V de Kauffmann) et elles donnaient une lyse confluyente et totale avec les phages Vi spécifiques (phages E₁ et E₂). Un nouvel isolement sur plaque de gélose montrait une homogénéité d'irisation parfaite parmi les colonies.

A l'opposé, les subcultures des colonies bleues donnaient une

agglutination positive avec le sérum anti-O et pas d'agglutination avec le sérum anti-Vi (formes non Vi ou W). Elles n'étaient pas lysées par les phages spécifiques.

Enfin les subcultures des colonies vertes étaient agglutinées à la fois par les sérums anti-Vi et anti-O (formes Vi-agglutinables et O-agglutinables ou VW). Elles donnaient avec les phages Vi spécifiques E₁ et E₂ une lyse confluyente, mais voilée.

L'étude morphologique, à la loupe binoculaire, de ces diverses colonies, nous a montré que les bords des colonies jaunes étaient

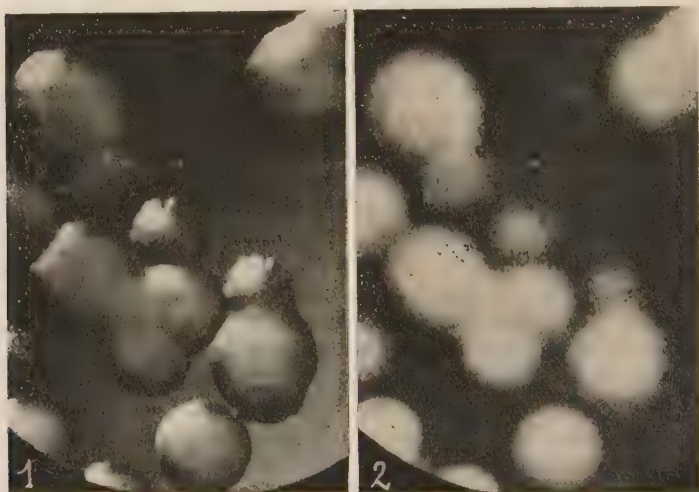


FIG. 1. — *Salmonella typhi*, souche J.877. Séparation de colonies. Culture de vingt heures, à 37°, sur gélose ordinaire. $\times 10$; 1, éclairage latéral; 2, aspect par transparence. (Photographies du Laboratoire Central de Bactériologie de l'Armée.)

très régulièrement arrondis, leur surface lisse et brillante, leur forme bombée. Par transparence, elles paraissaient nettement opaques et de structure finement granuleuse (fig. 1, clichés 1 et 2, colonie isolée en bas et au milieu). Les subcultures obtenues à partir d'une telle colonie ont donné des colonies ayant les mêmes caractères morphologiques (fig. 2, clichés 1 et 2).

Les colonies vertes se présentaient sous un aspect sensiblement différent : les bords étaient réguliers, mais un peu festonnés, leur surface, moins luisante, était chagrinée et, par transparence, elles étaient moins opaques et de structure un peu plus granuleuse (fig. 1, clichés 1 et 2, colonie à gauche et en haut).

Ces caractères ont été retrouvés sur les subcultures (fig. 2, clichés 3 et 4 et clichés 5 et 6, colonie de droite).

Les colonies bleues offraient une apparence nettement différente : leurs bords étaient irréguliers, plus ou moins profondément déchiquetés, leur surface tomenteuse et vallonnée. Par transparence, elles se montraient grossièrement granuleuses et présentaient l'aspect « mosaïque apparence » décrit par Craigie et Brandon. Cette morphologie se rapprochait évidemment de celle qu'il est classique de décrire pour les variantes R des *Salmonella*. Mais il convient de préciser que, dans le cas présent, les subcultures de ces colonies bleues restaient stables en milieux liquides de différentes densités, qu'elles n'étaient pas agglutinées par une solution de trypaflavine à 1 p. 500 (Pampana, 1933, Sertic et Boulgakov, 1936) et qu'elles donnaient une réaction de Millon négative (White, 1929). Malgré leur aspect morphologique, elles devaient donc être considérées comme des variantes « Smooth » (fig. 1, clichés 1 et 2, colonie centrale et fig. 2, clichés 5 et 6, colonie de gauche).

Ces résultats, obtenus au cours d'une dizaine d'expériences, sont schématisés dans le tableau I.

Les souches de *S. typhi* J. 862 et J. 876, qui appartenaient respectivement aux types bactériophagiques D₁ et A, nous avaient fourni également une lyse voilée avec les phages homologues. Par isolement de colonies, ces souches se montraient elles aussi hétérogènes, mais elles n'étaient constituées que par deux sortes de colonies : colonies vertes et bleues pour la souche J. 862 et colonies jaunes et bleues pour la souche J. 876. A ces divers aspects correspondaient les mêmes différences morphologiques, antigéniques et bactériophagiques que pour les colonies correspondantes de la souche J. 877.

Lorsqu'on examine, au contraire, des souches de *S. typhi* qui donnent avec les phages spécifiques la lyse totale et qui sont Vi-agglutinables et O-inagglutinables (formes Vi pures ou V), les colonies présentent une parfaite homogénéité d'irisation (colonies jaune orangé). De même pour les souches Vi-inagglutinables et O-agglutinables (formes dépourvues de Vi ou W). Dans ce cas toutes les colonies prennent la coloration bleue.

2° *Homogénéité* de *S. paratyphi* B. — Parmi les très nombreuses souches de *S. paratyphi* B soumises à la méthode de Felix et Callow (1943) en vue de la caractérisation des types bactériophagiques, nous n'avons jamais observé un phénomène analogue à celui qui nous a été fourni par les trois souches de *S. typhi* précédemment étudiées : avec les phages donnant d'habitude une lyse complète (phages Taunton et anti-O), nous n'avons jamais observé de lyse voilée.

D'autre part, les isollements de colonies nous ont montré chez *S. paratyphi* B une homogénéité parfaite sous le rapport de l'aspect des colonies soumises à la transillumination oblique.

TABLEAU I. — Schéma des relations entre les divers aspects, la constitution antigénique et la sensibilité aux phages Vi spécifiques des colonies de *Salmonella typhi*, souche J. 877.

CARACTÈRES MORPHOLOGIQUES DES COLONIES					CARACTÈRES ANTIGÉNIQUES			SENSIBILITÉ aux phages Vi	
Transillumination oblique			Eclairage latéral		Agglutination par serum		Formes de Kaufmann	Lyse par les phages Vi	
Coloration	Luminosité	Degré d'irisation	Morphologie	Structure	IX	Vi			
Jaune orangé.	+++	+++	Bords régulièrement arrondis ; surface lisse, bombée.	Finement granuleuse.	—	+	V	Totale.	Totale.
Verte.	++	++	Bords légèrement fess- tonnés, surface cha- grinée.	Granuleuse.	+	+	V-W	Voilée.	Voilée.
Bleue.	+	+	Bords irréguliers ; sur- face vallonnée.	Grossièrement granuleuse.	—	+	W	Nulle.	Nulle.

Les minimas différences de coloration observées dans quelques très rares cas ne correspondaient à aucune différence dans la sensibilité aux phages spécifiques.

Cependant, une seule fois, nous avons constaté pour une souche étiquetée *S. paratyphi* B P. 8, qui nous avait été envoyée par un

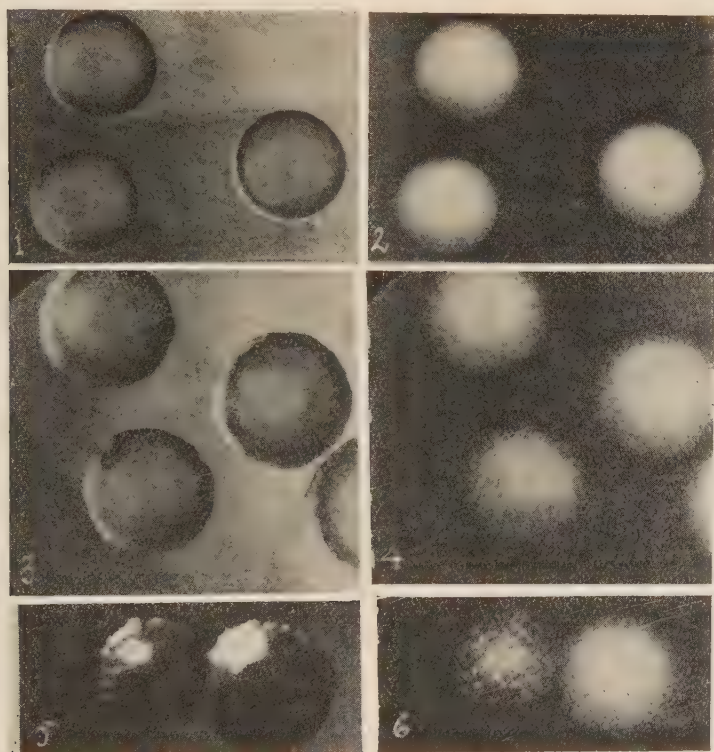


FIG. 2. — Colonies diverses de *Salmonella typhi*, souche J. 877. Cultures de vingt heures, à 37°, sur gélose ordinaire. $\times 10$; 1, colonies jaune-orangé, éclairage latéral; 2, colonies jaune-orangé, examinées par transparence; 3, colonies vertes, éclairage latéral; 4, colonies vertes, examinées par transparence; 5, colonie bleue et colonie verte, éclairage latéral; 6, colonie bleue et colonie verte, examinées par transparence. (Photographies du Laboratoire Central de Bactériologie de l'Armée.)

de nos collègues d'outre-mer, une lyse fortement voilée avec les phages Taunton et anti- « O ». En dépit de cette lyse voilée, le type bactériophagique de cette souche pouvait se lire : c'était le Type 3 b. Cet aspect voilé était très analogue à celui que nous avons décrit pour les souches Vi dégradées de *S. typhi*. Nous avons alors pratiqué des isolements de colonies. Celles-ci, exami-

nées par la transillumination oblique, se sont présentées sous deux aspects très différents ; certaines colonies étaient jaune orangé et d'autres étaient vertes.

Par l'examen à la lumière du jour, les deux types de colonies ne pouvaient pas être distingués. Mais à un fort grossissement (loupe binoculaire) et avec l'éclairage latéral, il apparaissait des différences assez importantes : les colonies qui se coloraient en bleu à la transillumination oblique présentaient une surface cha-

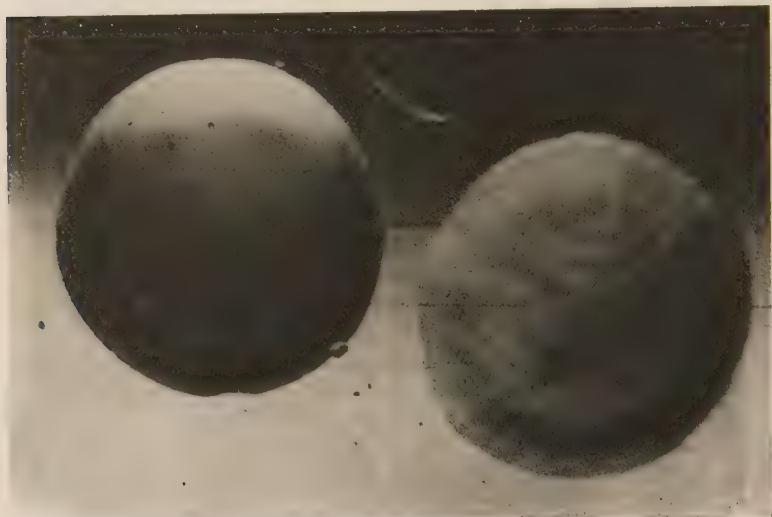


FIG. 3. — *Salmonella paratyphi* B, souche P.8 (contaminée). Culture de vingt heures, à 37°, sur gélose ordinaire; éclairage latéral. $\times 20$; à gauche : colonie de *S. newport*; à droite, colonie de *S. paratyphi* B. (Photographie du Laboratoire Central de Bactériologie de l'Armée.)

grinée et des bords légèrement ondulés (fig. 3, colonie de droite). Les colonies jaune orangé étaient au contraire parfaitement rondes, lisses et bombées (fig. 3, colonie de gauche).

Les subcultures des colonies vertes étaient homogènes à la transillumination oblique et présentaient les caractères biochimiques de *S. paratyphi* B, de formule antigénique IV-V ; b-1,2. Le type bactériophagique était le Type 3 b.

Les subcultures des colonies jaune orangé également homogènes à la transillumination oblique présentaient les caractères biochimiques de *S. newport*, de formule antigénique VI-VIII ; eh-1,2. Elles étaient insensibles aux phages spécifiques pour *S. paratyphi* B. Elles n'étaient lysées que par le phage anti-« O ». La souche P. 8 était donc un mélange de deux *Salmonella*. L'exis-

tence de ce mélange avait pu être soupçonnée par le « phage typing » et confirmée par la transillumination oblique. L'enquête a montré, par la suite, qu'il ne s'agissait pas d'une infection mixte, mais d'une contamination accidentelle de la souche de *S. paratyphi* B par *S. newport*.

DISCUSSION. — L'examen par la transillumination oblique permet de déceler parmi les colonies de certaines souches de *S. typhi* une hétérogénéité d'irisation.

Cette hétérogénéité d'irisation, à notre connaissance, n'a pas encore été signalée. Elle doit être rapprochée de l'hétérogénéité d'opacité à l'éclairage latéral (colonies opaques et colonies transparentes), constatée pour le même germe par Craigie et Brandon en 1936, puis par Giovanardi en 1938, et confirmée par Malik, la même année. D'après ces auteurs, les colonies opaques de *S. typhi* sont riches en antigène Vi, tandis que les colonies transparentes en sont dépourvues.

D'autre part, la présence de colonies plus opaques a permis à Kauffmann et Möller, en 1940, de distinguer chez *S. ballerup* des colonies riches en antigène Vi à côté de colonies n'en possédant pas.

L'analyse antigénique et l'action des phages Vi spécifiques ont montré que l'hétérogénéité d'irisation des souches examinées était liée elle aussi à la présence ou à l'absence de ce même facteur antigénique. La recherche de l'irisation a toutefois, sur l'évaluation de l'opacité, l'avantage de mettre en évidence des contrastes beaucoup plus accusés et de faire apparaître des colonies d'aspect intermédiaire, jusqu'à présent non signalées à notre connaissance. L'existence de telles colonies pose d'intéressants problèmes que nous nous efforçons actuellement de résoudre.

Les caractères mis en évidence, tant par la transillumination oblique que par l'éclairage latéral, correspondent, du moins pour les souches que nous avons étudiées, à des aspects morphologiques bien déterminés des colonies elles-mêmes. Les colonies Vi montrent l'apparence générale attribuée aux formes « Smooth » tandis que les colonies dépourvues de cet antigène ressemblent aux formes « Rough ». Cependant, dans nos expériences, elles ne possédaient pas les caractères physiques considérés comme révélateurs de ces formes : instabilité dans les solutions salines, agglutinabilité par la trypanflavine et précipitation par le réactif de Millon.

En opposition avec l'hétérogénéité d'irisation observée chez *S. typhi*, les nombreuses souches de *S. paratyphi* B examinées à la transillumination oblique se sont toutes montrées parfaitement homogènes. A ce résultat, si différent de celui qui a été constaté pour *S. typhi*, correspond une sensibilité remarquable-

ment constante aux phages spécifiques utilisés pour la détermination des types : c'est ainsi que nous n'avons jamais observé de lyse voilée chez les souches pures. Dans le seul cas où nous l'avons rencontrée (souche P. 8), il s'agissait d'un mélange de deux *Salmonella* appartenant à des groupes différents (B et C₂).

RÉSUMÉ. — La transillumination oblique révèle, chez certaines cultures de *S. typhi* en couche continue ou en colonies isolées (cultures à la fois Vi-agglutinables et O-agglutinables ou formes VW), d'importantes différences dans leur irisation. A ces différences correspondent des variations dans l'agglutinabilité Vi et O et des modifications de l'aspect morphologique des colonies examinées au microscope. Trois sortes de colonies sont décrites : les colonies à irisation prédominante jaune, les colonies à irisation prédominante verte, les colonies à irisation prédominante bleue.

Au contraire, les cultures de *S. typhi* Vi-agglutinables et O-inagglutinables (forme V), ainsi que les cultures Vi-inagglutinables et O-agglutinables (formes W), se sont montrées généralement homogènes dans l'irisation de leurs colonies.

Chez *S. paratyphi* B, l'homogénéité d'irisation des colonies est constante.

BIBLIOGRAPHIE

- CRAIGIE (J.) et BRANDON (K. F.). *J. Path. a. Bact.*, 1936, **43**, 233.
FELIX (A.) et CALLOW (B. R.). *Brit. Med. J.*, 1943, **2**, 127.
GIOVANARDI (A.). *Zentralbl. Bakt.*, 1938, **141**, 341.
JUDE (A.) et NICOLLE (P.). *Ces Annales*, 1949, **77**, 550.
KAUFFMANN (F.) et MOELLER (E.). *J. Hyg.*, 1940, **40**, 246.
MALEK (I.). *C. R. Soc. Biol.*, 1938, **129**, 785.
PAMPANA (E.). *J. Hyg.*, 1933, **33**, 402.
SERTIC (V.) et BOULGAROV (N. A.). *C. R. Soc. Biol.*, 1936, **122**, 35.
WHITE (P. B.). *J. Path. a. Bact.*, 1929, **32**, 85.

SALMONELLES ET SALMONELLOSES
A MADAGASCAR
DE DÉCEMBRE 1946 A MAI 1949

par R. NEEL, J. GRABAR et L. LE MINOR.

(*Instituts Pasteur de Paris et de Tananarive.*)

INTRODUCTION.

L'isolement fortuit en décembre 1946 de 2 souches de *Salmonella paratyphi* C nous a incités à commencer l'inventaire des Salmonelloses humaines et animales de Madagascar.

En plus de la recherche systématique des Salmonelles chez l'homme, pratiquée sur le matériel adressé quotidiennement au Laboratoire clinique de l'Institut Pasteur de Tananarive, nous avons borné nos investigations aux seules espèces animales porcine et murine (1).

DES SALMONELLES ISOLÉES AVANT 1946.

Bouffard et Girard [1] en 1922, avaient montré l'existence à Tananarive de la fièvre typhoïde bactériologiquement confirmée. Depuis cette époque, de nombreux bacilles d'Eberth et quelques germes étiquetés paratyphique A, paratyphique B et Salmonelle figurent dans les rapports annuels de l'Institut Pasteur de Tananarive. Mais une étude antigénique complète de ces bacilles n'a pas été faite.

Trois de ces souches, à l'exclusion des bacilles d'Eberth, ont été retrouvées et étudiées du point de vue de leur équipement antigénique. Ce sont :

1° Une *Salmonella paratyphi* B. — Biochimiquement classique et antigéniquement complète. Elle a été isolée en 1928 par coproculture chez un enfant européen.

Il est nécessaire d'insister sur les circonstances de son isolement [2]. Un nourrisson européen vacciné récemment au BCG,

(1) Nous remercions bien vivement : MM. les D^{rs} Payet, Journe et de Lostalot qui nous ont si aimablement ouvert leur service hospitalier respectif ; M. le docteur-vétérinaire Bück, chef du Laboratoire de l'Élevage et des Industries animales, qui nous a procuré régulièrement des ganglions mésentériques de porc ; M. le D^r Estrade, directeur du Bureau municipal d'Hygiène de la ville de Tananarive, qui nous a fait envoyer des rats capturés par le Service de dératisation municipal.

présentait un syndrome typhoïdique, dont on rendait responsable la vaccination antituberculeuse. La mise en évidence du germe dans les selles permit de rectifier le diagnostic. L'enquête épidémiologique révéla que le frère de l'enfant avait fait un an auparavant en France une fièvre paratyphoïde bactériologiquement confirmée, d'origine alimentaire. L'origine locale du germe était donc à exclure.

2° Une *Salmonella typhi murium*. — Biochimiquement classique et antigéniquement complète. Elle fut isolée par hémoculture en 1945 chez un autochtone qui décéda rapidement.

3° Une *Salmonella paratyphi C*. — Biochimiquement classique, mais antigéniquement en phase non spécifique. Elle a été isolée par hémoculture chez un autochtone en 1943.

Nous ne ferons pas état de ces données fragmentaires dans nos statistiques qui groupent le résultat de recherches portant sur une période de trente mois.

FRÉQUENCE DES DIFFÉRENTS TYPES DE *Salmonella*.

Le tableau I donne la fréquence des différents types de *Salmonelles* humaines et animales isolées à Madagascar de décembre

TABLEAU I. — Fréquence des différents types de *Salmonella*.

<i>Salmonella</i>		HUMAINES				PORCINES	MURINES
Groupe	Espèce	Nombre de souches	Nombre de malades			Nombre de souches	Nombre de souches
			Européens	Malgaches	Total		
A	<i>S. paratyphi A.</i>	6	2	3	5		
B	<i>S. typhi murium.</i>	10	4	3	7	1	
C1	<i>S. paratyphi C.</i>	11	1	10	11		
	<i>S. cholerae suis.</i>	3		1	1		
	<i>S. oranienburg.</i>					1	
C2	<i>S. manhattan.</i>	1		1	1		
	<i>S. newport.</i>	7	3	4	7	8	1
	<i>S. lananarive.</i>					1	
D	<i>S. typhi.</i>	166	35	121	156		
E	<i>S. anatum.</i>	3	2	1	3	3	1
	<i>S. london.</i>	8	6	2	8	3	
	<i>S. senftenberg.</i>	1	1		1		
Totaux		216	54	146	200	17	2

1946 à mai 1949. Nous les avons classées d'après le schéma de Kauffmann, 1946 [3], dans lequel ne figure pas une nouvelle espèce récemment décrite : *Salmonella tananarive* [4].

Plusieurs souches d'un même type ont parfois été isolées chez le même malade. Nous avons donc en regard du nombre total des souches fait figurer le nombre de malades.

L'origine européenne ou malgache a été précisée. Cette indication est indispensable pour apprécier la diffusion de la *Salmonelle* considérée, l'isolement chez l'autochtone étant le seul critère qui permette d'apprécier l'implantation locale de l'espèce en cause.

Chez l'homme, à l'exclusion de *Salmonella typhi*, 9 espèces différentes ont été rencontrées. Ce sont, par ordre de fréquence, *S. paratyphi* C, *S. london*, *S. newport* et *S. typhi* murium, *S. paratyphi* A, *S. cholerae* suis, *S. manhattan* et *S. senftenberg*. Ce dernier type est le seul qui n'ait pas été rencontré chez le malgache.

Chez le porc, 6 espèces différentes ont été isolées. Ce sont, par ordre de fréquence : *S. newport*, *S. anatum*, *S. london*, *S. typhi* murium, *S. oranienburg* et *S. tananarive*.

Chez le rat, nous avons retrouvé *S. newport* et *S. anatum*.

DES SALMONELLES HUMAINES.

1° ORIGINE DES SOUCHES. — Les *Salmonelles* ont été isolées à partir des selles, du sang, du L.C.R., de pus d'abcès et d'arthrite suppurée, de la bile, du liquide pleural et du liquide d'ascite. Nous n'en avons pas trouvé dans les urines.

La fréquence de l'origine est consignée dans le tableau II.

Les techniques de l'isolement étaient les suivantes :

a) *Sang* (hémoculture en bouillon ordinaire, en ballon de 250 cm³). Dans un essai portant sur 45 hémocultures, nous avons comparé les résultats obtenus avec l'hémoculture ordinaire et l'hémoculture en milieu de Muller-Kauffmann (ensemencement de 1 cm³ de sang dans 20 cm³ de milieu de Muller-Kauffmann). Sur 16 hémocultures classiques positives (14 *Salmonella typhi* et 2 *Salmonella paratyphi* C), nous avons eu avec le milieu de Muller-Kauffmann 14 résultats positifs dont un négatif sur bouillon ordinaire (12 *S. typhi* et 2 *S. paratyphi* C). Le pourcentage de positivité est donc inférieur, et sans intérêt en milieu hospitalier. Mais en milieu autochtone et en brousse, ce procédé prend toute sa valeur, car l'utilisation du milieu de Muller-Kauffmann en vénules, permettrait la recherche des *Salmonelles* au cours des syndromes typhoïdiques. Les risques de souillures si fréquents en milieu colonial ne seraient plus à redouter, les bactéries du genre *Bacillus* ou *Staphylococcus* ne cultivant pas en milieu au vert brillant.

TABLEAU II. — Origines des *Salmonella* humaines.

<i>Salmonella</i>			SELLE	SANG	L. C. R.	ARCÈS	ARTHRITE suppurée	BILE	LIQUIDE PLEURAL ascite.
Groupe	Espèce	Nombre							
A	<i>S. parat. A.</i>	6	2	4					
B	<i>S. typhi murium.</i>	10	8						2
C1	<i>S. paratyphi C.</i>	11		11					
	<i>S. cholerae suis.</i>	3		1	1		1		
C2	<i>S. manhattan.</i>	1	1						
	<i>S. newport.</i>	7	7						
D	<i>S. typhi.</i>	166	20	140	1	3		1	1
E	<i>S. anatum.</i>	3	3						
	<i>S. london.</i>	8	7	1					
	<i>S. senftenberg.</i>	1	1						
Totaux		216	49	157	2	3	1	1	3

b) *Selles* : en l'absence de gélose S. S., isolement, après dilution des selles non muqueuses ou lavages des mucosités, sur gélose ordinaire lactosée au bleu de bromothymol associé à la méthode de Kauffmann [3] (enrichissement sur Muller-Kauffmann et isolement sur Kristensen-Kauffmann).

c) *Autres produits pathologiques* : milieux variés associés au milieu d'enrichissement de Muller-Kauffmann.

Toutes les souches ont été identifiées :

1° Par examen des réactions biochimiques sur eau peptonée, tube B, additionnée de bleu de bromothymol et des sucres suivants : lactose, glucose, maltose, mannite, saccharose. Recherche de l'indol et de l'H₂S. Action sur le lait. Action sur milieu à l'urée de Fergusson.

2° Par un premier examen antigénique à l'aide des sérums préparés par le centre des *Salmonella* de Paris : II, III, IV, VII, VIII, IX, Vi, et des principaux sérums II spécifiques et non spécifiques.

3° Toutes les souches étaient ensuite expédiées au centre des *Salmonella* de l'Institut Pasteur de Paris pour identification biochimique et sérologique complète.

2° SYNDROMES CLINIQUES OBSERVÉS. — Ils peuvent se résumer dans les trois grands syndromes suivants : syndrome typhoïdique

ou septicémique, gastro-entérite ou entéro-colite, syndrome dysentérique.

Le tableau III donne la fréquence de ces diverses manifestations cliniques.

TABLEAU III. — Fréquence des syndromes cliniques observés.

<i>Salmonella</i>		NOMBRE DE CAS	SYNDROME typhoïdique	GASTRO-ENTÉRITE	SYNDROME dysentérique	LOCALISATIONS diverses	PORTEUR de germes
Groupe	Espèce						
A	<i>S. paratyphi</i> A.	5	5				
B	<i>S. typhi murium</i> .	7 (1)	2	1	5		1
C1	<i>S. paratyphi</i> C.	11	11				
	<i>S. cholerae suis</i> .	1 (2)	1			2	
C2	<i>S. manhattan</i> .	1	1				
	<i>S. newport</i> .	7		2	5		
D	<i>S. typhi</i> .	156	151			3	2
E	<i>S. anatum</i> .	3			3		
	<i>S. london</i> .	8		2	5	1	
	<i>S. senftenberg</i> .	1		1			
Totaux		200	171	6	18	5	3

(1) Les deux cas de fièvre typhoïde à *S. typhi murium* débutèrent par un syndrome dysentérique.

(2) Au cours du syndrome typhoïdique à *S. cholerae suis*, on observa un syndrome méningé sévère et une arthrite suppurée de la hanche.

a) Signalons pour *Salmonella typhi* les localisations exceptionnelles suivantes :

Une méningite purulente ;

Un abcès de la fesse survenu six ans après une fièvre typhoïde bactériologiquement confirmée et sans lésions osseuses malgré les nombreuses radiographies de contrôle pratiquées (Dr Seguy) ;

Un ascitique apyrétique, porteur d'une *S. typhi* dans son liquide de ponction, citrin et à cyto-diagnostic d'épanchement mécanique ;

Enfin un bacille d'Eberth isolé de selles diarrhéiques chez un enfant qui commença son premier septénaire le jour du prélèvement des selles.

b) *Syndromes paratyphoïdiques*. — Ils furent normaux ou à évolution bénigne avec *S. paratyphi* A.

Deux d'entre eux furent causés par *S. typhi murium* : les deux fois, on eut affaire à des nourrissons, dont l'infection débuta par un syndrome dysentérique au cours duquel la *Salmonella* fut isolée, et qui évolua alors d'une façon classique, se compliquant chez l'un d'eux de péritonisme. Le séro-diagnostic fut pratiqué vers le dix-huitième jour. Il donna respectivement les résultats suivants avec des antigènes formolés anti-*S. paratyphi* B (II) et *S. typhi murium* (H) :

Pour le premier malade : 1/400 et 1/1.600, en accord avec la formule antigénique diphasique de la souche isolée de ce même malade :

Pour le deuxième : 1/100 et 1/3.200, la souche isolée étant monophasique spécifique.

Les autres syndromes paratyphiques relèvent tous de *Salmonelles* du groupe C.

Onze fois, *Salmonella paratyphi* C en fut l'agent étiologique et aucune manifestation purement gastro-entérique ou entérique ne fut relevée à son actif, comme cela se rencontre fréquemment dans les pays tempérés.

Le syndrome clinique peut se résumer ainsi, en dehors de 2 cas à évolution écourtée et guérison rapide, malgré l'intensité des phénomènes généraux observés :

Début souvent brutal, avec parfois présence d'hématozoaires.

Température élevée, aux alentours de 39°, 40°, à grandes oscillations.

Prostration très accentuée. Quelquefois agitation, délire.

Signes digestifs : en général peu accentués : langue saburrale, gargouillements dans la fosse iliaque, alternative de diarrhée et de constipation, mais jamais d'hémorragie ou de perforation.

Signes méningés constants, le plus souvent précoces, parfois intenses : Kernig, raideur de la nuque, céphalée, sans réaction cellulaire du L. C. R. dans les 4 cas où cet examen fut pratiqué.

Pronostic sombre, puisque 4 malades succombèrent en présentant des accidents nerveux d'ordre ataxo-dynamique et du collapsus cardiaque.

L'hémoculture fut toujours positive dans les vingt-quatre heures.

Des séro-diagnostic de contrôle furent pratiqués [6] dans les cas qui guérirent, et ne purent être faits dans les cas mortels en raison de la brutalité du décès. Avec un antigène para CH diphasique formolé, les taux observés varièrent de 1/800 à 1/12.800.

En résumé, *S. paratyphi* C à Madagascar est responsable d'un syndrome toxi-infectieux grave.

Avec *S. cholerae suis*, on nota vers le cinquième jour une forte réaction méningée, au cours de laquelle le germe fut isolé du

L. C. R, qui présentait une légère réaction cellulaire (17 éléments au millimètre cube) à prédominance lymphocytaire. L'affection prit ensuite une allure chronique et deux mois après le début apparut une luxation pathologique de la hanche par arthrite suppurée dans le pus de laquelle le bacille fut à nouveau isolé. Le séro-diagnostic avec une émulsion para CH diphasique formolée fut positif à 1/3.200. Malgré l'absence de complications endocarditiques, on eut affaire à une des formes classiques de l'évolution du syndrome paratyphique à *S. cholerae suis* [7].

S. manhattan fut à l'origine du dernier cas. Là encore le syndrome méningé fut prédominant au début.

En résumé le syndrome méningé précoce semble signer les paratyphoïdes du groupe C à Madagascar.

c) *Formes gastro-entéritiques*. — Les formes gastro-entéritiques ou entéritiques reconnurent comme agents étiologiques : *S. typhi murium*, *S. newport*, *S. london* et *S. senftenberg*. Elles prirent deux fois une forme trainante à rechutes.

d) *Syndromes dysentériques*. — Dix-huit fois une Salmonelle fut à l'origine de ce syndrome : *S. typhi murium*, *S. newport*, *S. anatum* et *S. london*. Ce syndrome se montra en général bénin. Cependant il revêtit parfois une allure plus sévère : forte température, tendance à la chronicité. Avec *S. newport*, le syndrome prit une fois une allure cholériforme avec algidité et mort rapide. Enfin *S. london* fut isolée une fois du sang au cours d'une appendicite suppurée, qui aurait été précédée d'un syndrome dysentérique typique.

La fréquence relative des syndromes dysentériques à Salmonelles pose un problème thérapeutique, la sulfaguanidine étant sans action sur les *Salmonella* [8] : l'échec de cette thérapeutique ne devra pas faire toujours penser à une « amibiase méconnue », mais aussi à une Salmonellose méconnue. Il convient donc de retenir cette étiologie possible des syndromes dysentériques puisqu'elle représente 8 p. 100 des cas de dysenterie bacillaire observée contre 92 p. 100 aux *Shigella*.

L'isolement dans la même selle de germes appartenant aux deux genres était prévisible. Cette association *Salmonella-Shigella* a été trouvée deux fois [9] :

Salmonella anatum avec *Shigella flexneri* II (Ewing-1949) [10] ;

S. typhi murium avec *Shigella flexneri* VI (Ewing-1949).

Une autre fois nous avons noté :

S. london avec bacille de Wakefield (*Shigella Wakefield* de certains auteurs).

e) *Porteur de germes*. — *S. typhi murium* fut trouvé à deux reprises dans le liquide pleural d'un asystolique cardio-rénal, d'aspect citrin et à formule cytologique à prédominance endothéliale.

3° INCIDENCE DE L'ÂGE. MORTALITÉ. — Le tableau III résume la répartition par âge et la mortalité, à l'exclusion de *Salmonella typhi*. Pour cette dernière espèce, sur 40 malades qui purent être suivis, 10 décédèrent, soit une mortalité de l'ordre de 25 p. 100.

Pour *S. paratyphi C*, nous avons observé 4 décès pour 11 cas.

TABEAU IV. — Incidence de l'âge. Mortalité (à l'exclusion de *S. typhi*).

<i>Salmonella</i>		NOMBRE	0 A	1 A	AU-DESSUS	NOMBRE
Groupe	Espèce	de cas	1 AN	10 ANS	de 10 ans	de décès
A	<i>S. paratyphi A</i>	5			5	
B	<i>S. typhi murium.</i>	7	2	2	3	
C1	<i>S. paratyphi C.</i>	11		1	10	4
	<i>S. cholerae suis.</i>	1			1	
C2	<i>S. manhattan.</i>	1			1	
	<i>S. newport.</i>	7	1	1	5	1
E	<i>S. anatum.</i>	3		1	2	
	<i>S. london.</i>	8		2	6	
	<i>S. senftenberg.</i>	1			1	
Totaux		44	3	7	34	5

4° ASPECT ÉPIDÉMIOLOGIQUE. — La fièvre typhoïde sévit à Tananarive à l'état endémique pendant toute l'année, mais les cas s'espacent pendant la saison froide : juin à octobre, tandis qu'une ascension marquée se produit avec le début de la saison des pluies : fin novembre à fin décembre. L'acmé a lieu en février et la poussée se termine en mai.

La courbe de fréquence des autres Salmonelloses est absolument superposable : 36 cas de novembre à mai pour 8 de juin à octobre. Tous les syndromes paratyphiques furent observés de novembre à mai.

5° FRÉQUENCE COMPARÉE EN MILIEU TROPICAL DES SALMONELLOSES.

— Il est assez difficile d'avoir une idée de la fréquence comparée des Salmonelloses en milieu tropical ou subtropical. De nombreuses statistiques ne font état que des principaux germes : *S. typhi*, *S. paratyphi A* et B. D'autres sont basées uniquement sur les germes isolés par hémoculture.

Nous donnons à titre indicatif celle établie par Raynal et Fournier à Changhaï [41] sur des données identiques aux nôtres. Celle d'Erber, pour les Indes Néerlandaises, est comparable à cette dernière [42].

Le tableau V donne les pourcentages comparés par espèce et par groupe, à l'exclusion de *S. typhi* qui forme à Changhaï 74 p. 100 du nombre total des Salmonelles contre 78 p. 100 à Tananarive.

a) DONNÉES GÉNÉRALES. — On admet [44], lorsque l'on passe des régions froides et tempérées aux régions chaudes méditerranéennes et tropicales, que :

S. paratyphi A, de rare, devient très fréquente et même peut être le type prédominant ;

S. paratyphi B et les espèces du groupe B, au contraire, deviennent exceptionnelles ;

S. paratyphi C et les germes du groupe C 1 sont, par contre, très nombreux ;

Pour *S. enteritidis*, l'influence de la latitude est peu nette ;

Les Salmonelles des groupes C 2 et E restent toujours rares.

TABLEAU V. — Fréquence comparée des Salmonelloses à Changhaï et à Tananarive — à l'exclusion de *Salmonella typhi*.

GROUPE	<i>Salmonella</i>	POURCENTAGE par espèce		POURCENTAGE par groupe	
		Tananarive	Changhaï	Tananarive	Changhaï
A	<i>S. paratyphi</i> A.	11,4	35	11,4	35
B	<i>S. paratyphi</i> B.		5,7		
	<i>S. derby.</i>		1,2		
	<i>S. typhi</i> murium.	15,3	2,3	15,3	9,2
C1	<i>S. paratyphi</i> C.	25	12		
	<i>S. cholerae</i> suis.	2,3	12	27,3	30
C2	<i>S. manhattan.</i>	2,3		17,6	2,4
	<i>S. newport.</i>	15,3	2,4		
D	<i>S. enteritidis.</i>		20		
	<i>S. sendai.</i>		1,2		21,2
E	<i>S. anatum.</i>	6,9	1,2		
	<i>S. london.</i>	18,2	1,2	27,4	2,4
	<i>S. senftenberg.</i>	2,3			

b) LA FRÉQUENCE A MADAGASCAR. — A Madagascar, les règles précédentes semblent souffrir de nombreuses exceptions :

S. paratyphi A est peu rencontrée ;

Conformément aux données précédentes, *S. paratyphi* B semble ne pas s'être implantée dans la Grande Ile ou alors y serait exceptionnelle, malgré le passage de nombreux éléments étrangers à la suite de la guerre 1939-1945 et de la rébellion de

1947-1948. Nous n'en avons pas trouvé un seul cas, et l'unique souche identifiée (en 1928) n'a pas eu une origine locale ;

Par contre, *S. typhi murium* est assez fréquente ;

S. paratyphi C est l'espèce la plus commune ;

S. newport se retrouve souvent.

Le groupe C forme à lui seul plus de 44 p. 100 des souches isolées.

En dehors de *S. typhi*, nous n'avons pas trouvé de représentant du groupe D.

Enfin les Salmonelles du groupe E sont très communes : plus de 27 p. 100 (en particulier *S. london*).

c) CONCLUSIONS PRATIQUES. — Etant donné la fréquence et la gravité des affections à *S. paratyphi C*, la formule des vaccins malgaches ne serait ni celle d'un vaccin monovalent anti-Eberth, comme elle est pratiquée actuellement, ni celle du T. A. B., mais un vaccin T. C.

Il y aurait aussi intérêt dans les séro-diagnostic à adjoindre *S. paratyphi C*. Un essai de trois mois avec un antigène II diphasique a permis de déceler chez deux militaires vaccinés au T. A. B. une fièvre paratyphoïde C (taux de 1/600 et 1/3.200).

LES SALMONELLES PORCINES.

Les animaux examinés provenaient des élevages des provinces de l'Emyrne et d'Antsirabé.

Les 17 Salmonelles trouvées ont été isolées à partir de ganglions mésentériques de porcs considérés comme sains et livrés à la consommation, sauf une du type *newport*, retrouvée par ailleurs chez 7 animaux sains, sur un animal atteint de paralysie contagieuse (maladie de Teschen) [13].

La technique de l'isolement était la suivante : prélèvement stérile d'un fragment de ganglion, broyage au mortier avec du sable, ensemencement dans 10 cm³ de milieu de Muller-Kauffmann et isolement sur Kristensen-Kauffmann ou gélose lactosée bromothymolée.

168 examens furent pratiqués, d'où un pourcentage de positivité de 10,1 p. 100. La liste des espèces a été donnée au début de ce mémoire. La plus fréquente est *S. newport* : 47 p. 100.

Dans un même ganglion, deux Salmonelles ont été mises en évidence : *S. newport* et *S. anatum*.

Deux espèces n'ont été trouvées que chez le porc : *S. oranienburg* et *S. tananarive*.

LES SALMONELLES MURINES.

Nous n'avons examiné que 100 rats suivant deux procédés : pour 48 d'entre eux : coproculture suivant la méthode de Kauffmann,

le prélèvement étant fait à la partie subterminale du grêle, au voisinage de cæcum : une *S. newport* fut ainsi obtenue.

Pour les 52 autres, nous avons eu recours à la technique suivante : prélèvement aseptique des ganglions iliaques facilement repérables, broyage au mortier avec du sable, ensemencement en milieu de Muller-Kauffmann. Une *S. anatum* fut ainsi isolée.

Les deux rats positifs appartenaient à l'espèce *Epimys rattus*, variété *frugivorus*.

LES *Salmonella* COMMUNES A L'HOMME ET AUX ANIMAUX.

Le tableau VI donne la liste des espèces communes à l'homme et aux animaux.

TABLEAU VI. — *Salmonella* communes à l'homme, au porc et au rat.

<i>Salmonella</i>		HOMME	PORC	RAT
Groupe	Espèce			
B	<i>S. typhi murium.</i>	7	1	
C2	<i>S. newport.</i>	7	8	1
E	<i>S. anatum.</i>	3	3	1
	<i>S. london.</i>	8	3	

Sans vouloir tirer une conclusion quelconque de ce tableau comparatif très incomplet, on peut cependant se demander si la consommation de viande de porc ne joue pas un rôle dans l'origine de certains cas humains. Outre la consommation de charcuterie par les Européens, les autochtones consomment volontiers cuite ou crue la viande de porc. Ils l'achètent souvent à des prix avantageux à des éleveurs peu scrupuleux, qui abattent des bêtes malades et les débitent sans qu'aucune surveillance soit possible. S'il est fréquent de trouver des animaux sains hébergeant des *Salmonelles* dans leurs ganglions mésentériques, les porcs peuvent être atteints de *Salmonellose* (pneumonie ou gastro-entérite hémorragiques). De plus, ces bacilles peuvent aussi jouer le rôle de germes de sortie au cours des infections à virus filtrants (peste porcine...).

CARACTÈRES BIOCHIMIQUES ET ANTIGÉNIQUES DES SOUCHES.

Après un nouvel isolement de la souche sur milieu de Drigalski, les caractères biochimiques étaient étudiés sur les milieux suivants :

1° Eau peptonée additionnée de bleu de bromothymol et des

oses ou alcools suivants à la concentration de 0,5 p. 100 : xylose, arabinose, glucose, mannite, dulcité, lactose, maltose, saccharose. La fermentation du glycérol est étudiée sur milieu de Stern, celle du *d*-tartrate de sodium en utilisant la technique préconisée par Kauffmann (1941) et l'utilisation du citrate de soude au moyen du milieu de Simmons. L'action sur les protides (liquéfaction de la gélatine, production d'indol) est étudiée suivant les techniques habituelles, et le pouvoir réducteur en recherchant la production de SH₂ et la réduction du rouge neutre. Enfin la mobilité est appréciée en utilisant la gélose molle à 5 p. 100.

Pour les différentes souches, nous ne mentionnerons que les caractères particuliers.

CARACTÈRES BIOCHIMIQUES. — *S. paratyphi* A : Sur 6 souches, une seule produisait de l'SH₂.

S. typhi murium : Toutes les souches fermentaient le xylose, le glycérol. Toutes utilisaient le citrate.

S. cholerae suis : Toutes les souches étaient des variations Kunzendorf. Elles fermentaient toutes le *d*-tartrate et utilisaient le citrate de soude. Deux souches étaient dulcité négatives et une dulcité positive bien que provenant du même malade.

S. oranienburg : La souche isolée fermentait le glycérol.

S. typhi : Les souches ne furent pas examinées de manière complète au point de vue biochimique.

S. paratyphi C, *S. manhattan*, *S. newport*, *S. anatum*, *S. london*, *S. senftenberg* : Caractères typiques.

Pour *S. tananarive*, nous renvoyons à la publication où est décrite cette nouvelle espèce [4].

CARACTÈRES SÉROLOGIQUES. — *S. paratyphi* A : Toutes possédaient les antigènes I, II et *a*. Aucune variété Durazzo.

S. typhi murium : Sur 5 souches, 2 n'avaient pas l'antigène V. Toutes possédaient l'antigène *i* à l'isolement. Deux souches étaient diphasiques.

S. paratyphi C : 6 possédaient l'antigène Vi, et 5 autres en étaient dépourvues. Deux souches étaient diphasiques, 7 monophasiques spécifiques et 2 monophasiques non spécifiques. L'antigène *c* fut mis en évidence chez celles-ci par la méthode de Sven Gard.

S. cholerae suis : Toutes les souches étaient en phase non spécifique (variété Kunzendorf).

S. oranienburg : VI-VII — *m t*.

S. manhattan : diphasique (*d*—1,5).

S. newport : 14 des souches étaient diphasiques, 2 monophasiques spécifiques et 2 monophasiques non spécifiques (variété Puerto-Rico). La phase spécifique fut mise en évidence chez celles-ci par la méthode de Sven Gard.

S. typhi : Sur 99 souches étudiées, à l'isolement 59 étaient en forme V, 34 en forme VW et 6 en forme W.

S. anatum : Toutes les souches étaient diphasiques.

S. london : 10 souches diphasiques. Une monophasique non spécifique.

S. senftenberg : Diphasique.

Rappelons que la formule antigénique de *S. tananarive* est VI, VIII, y, 1,5.

CONCLUSIONS.

1° Chez l'homme, sur une période de trente mois, 44 Salmonelles (à l'exclusion de *S. typhi*), se répartissant en neuf espèces différentes, ont été isolées à Madagascar, soit 22 p. 100 de Salmonelles diverses pour 78 p. 100 de *S. typhi*.

2° Les types rencontrés sont, par ordre de fréquence : *S. paratyphi* C, *S. london*, *S. typhi* murium, *S. newport*, *S. paratyphi* A, *S. anatum*, *S. manhattan*, *S. cholerae* suis et *S. senftenberg*.

3° Cliniquement, on a observé des syndromes paratyphiques, des gastro-entérites et des syndromes dysentériques.

Les syndromes paratyphiques du groupe C sont caractérisés par un syndrome méningé précoce, parfois sévère, et le pronostic en est grave.

L'association *Salmonella-Shigella* n'est pas exceptionnelle au cours des syndromes dysentériques.

4° Chez le porc, 17 Salmonelles se répartissant en six espèces ont été isolées ; ce sont, par ordre de fréquence : *S. newport*, *S. anatum*, *S. london*, *S. typhi* murium, *S. oranienburg* et *S. tananarive* [4].

5° Chez le rat, on a isolé *S. newport* et *S. anatum*.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] BOUFFARD (A.) et GIRARD (G.). *Bull. Soc. Path. Exot.*, 1922, **15**, 675.
- [2] GIRARD (G.). *Bull. Soc. Path. Exot.*, 1930, **23**, 116.
- [3] KAUFFMANN (F.). *Ces Annales*, 1948, **74**, 478.
- [4] LE MINOR (L. et S.) et NEEL (R.). *Ces Annales*, 1949, **77**, 198.
- [5] LE MINOR (L.). *Thèse Paris*, 1945.
- [6] SOHIER (R.) et HENRY (R.). *Bull. Méd.*, 1938, **52**, 686.
- [7] TOPLEY, WILSON et MILES. *The Princ. of Bact. and Imm.*, Arnold, 1946.
- [8] BERNSTEIN (S.) et STRAUSS (L.). *Proceed. Soc. exp. Biol. a. Méd.*, 1941, **47**, 112.
- [9] NEEL (R.), SZTUM (S.) et PIECHAUD (M. et D.). *Bull. Soc. Path. Exot.*, 1949, **42**, 533.
- [10] EWING (W. H.). *J. Bact.*, 1949, **58**, 633.
- [11] RAYNAL (J.-H.) et FOURNIER (J.). *Méd. Trop.*, 1947, **7**, 199.
- [12] ERBER. *Eijkmann Institut*, 1940, **29**, 56.
- [13] LÉPINE (P.) et ATANASIU (P.). *Ces Annales* (sous presse).

LA TAILLE DES GERMES COMPOSANT LE VACCIN BCG D'APRÈS LE MILIEU D'ENTRETIEN; SON IMPORTANCE POUR LE DOSAGE DU VACCIN

par F. VAN DEINSE, R. SEYS et F. MACHOLDA (*).

(Institut Pasteur, Service du BCG.)

Dans un travail antérieur, l'un de nous, avec M^{lle} Pétrouva, a eu l'occasion de critiquer la méthode danoise d'entretien de la souche BCG par recensements en série seulement sur milieu de Sauton (1). Dans un travail d'ensemble, qui paraîtra bientôt ailleurs, l'un de nous décrit, avec M^{lle} Sénéchal, les expériences que nous avons faites avec une culture de notre BCG, entretenue ainsi pendant de longs mois uniquement sur milieu de Sauton.

Parmi les constatations auxquelles a donné lieu cette étude, la plus curieuse a été celle d'une diminution assez notable de la taille moyenne des bacilles composant ces cultures. Nous avons soumis ce phénomène à une étude spéciale, et ce sont les résultats de ces recherches que nous voudrions faire connaître aujourd'hui.

Nous avons préparé 6 frottis de chacune des différentes cultures et suspensions vaccinales étudiées, colorés au Ziehl, et sur chaque frottis nous avons mesuré au micromètre 100 bacilles pour en établir la longueur moyenne. Nous avons ainsi calculé chaque fois la longueur moyenne des bacilles sur les 6 frottis, c'est-à-dire de 600 bacilles.

Pour commencer, voici ce que nous avons trouvé pour une souche de BCG qui n'a jamais quitté la pomme de terre biliée depuis que Calmette et Guérin ont commencé à cultiver leur souche sur ce milieu, c'est-à-dire depuis quarante-deux ans.

Culture sur pomme de terre biliée âgée de trois semaines : longueur moyenne des germes, 2,873 μ .

Même culture âgée de sept semaines : longueur moyenne des bacilles, 2,618 μ .

Après l'ensemencement de cette culture biliée sur pomme de terre au Sauton, milieu habituel d'entretien de la souche BCG à l'Institut Pasteur, nos mensurations des germes composant cette

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 2 février 1950.

(1) F. VAN DEINSE et M^{lle} A. PETROVA, ces *Annales*, 1948, 74, 171.

culture de premier passage sur pomme de terre ont donné le chiffre suivant :

Culture âgée de quinze jours : longueur moyenne des bacilles, 2,741 μ .

Prenons maintenant une culture de BCG sur pomme de terre au Sauton, entretenue sur ce milieu depuis plusieurs années.

Culture âgée de huit jours : longueur moyenne des germes, 2,286 μ .

Même culture âgée de quinze jours : 2,705 μ .

Pour la préparation du vaccin, on ensemece d'abord quatre ballons de Sauton pur, en partant d'une culture sur pomme de terre au Sauton, âgée de quinze jours.

Culture de premier passage sur Sauton : longueur moyenne des bacilles de l'âge de huit jours, 2,350 μ ; à quinze jours, 2,732 μ ; à trois semaines, 2,866 μ .

En partant de ces cultures de premier passage sur milieu de Sauton, quand elles sont âgées de huit jours, on ensemece le nombre de ballons de Sauton nécessaires à la production du vaccin, qui est donc préparé avec des cultures sur Sauton de deuxième passage, quand elles ont de dix-sept à vingt et un jours d'âge.

Culture de deuxième passage sur Sauton : longueur moyenne des bacilles à l'âge de huit jours, 2,128 μ ; à quinze jours, 2,708 μ ; à trois semaines, 2,836 μ .

On voit qu'à l'âge de huit jours, les bacilles composant la culture de premier et surtout de deuxième passage sur Sauton sont nettement plus petits que par la suite et qu'à l'âge de trois semaines les germes ont atteint la taille qu'ils ont sur la pomme de terre.

Voyons maintenant ce qui se passe pour les cultures de BCG entretenues uniquement par réensemencements en série sur milieu de Sauton depuis plusieurs mois.

Culture réensemencée tous les huit jours sur milieu de Sauton depuis dix-huit mois : longueur moyenne des bacilles à l'âge de huit jours, 2,155 μ ; à quinze jours, 2,279 μ , à trois semaines, 2,274 μ .

Culture réensemencée tous les quinze jours sur milieu de Sauton depuis dix-huit mois : taille moyenne des bacilles à l'âge de huit jours, 2,194 μ ; à quinze jours, 2,412 μ ; à trois semaines, 2,235 μ .

Nous voyons, en récapitulant, que la longueur moyenne des bacilles, composant les cultures sur pomme de terre ou sur milieu de Sauton de premier ou de deuxième passage, telles que nous les utilisons à l'Institut Pasteur, est de 2,77 μ en moyenne. Et, fait remarquable, alors qu'on voit les bacilles d'une culture normale de deuxième passage sur milieu de Sauton, âgée de huit jours,

ne pas dépasser la taille moyenne de $2,218 \mu$, ces mêmes bacilles atteignent, à l'âge de trois semaines, c'est-à-dire quand ils vont servir à la préparation du vaccin, la longueur moyenne de $2,836 \mu$.

Par contre, quand on cultive le BCG par repiquages en série tous les huit jours uniquement sur milieu de Sauton, la taille des germes atteint en moyenne $2,236 \mu$, même quand on laisse vieillir la culture. De la même façon, quand on fait les réensemencements en série sur Sauton tous les quinze jours, la taille moyenne des germes est de $2,28 \mu$ et n'augmente pratiquement pas.

La figure 1 illustre ces différentes façons de se comporter des cultures sur Sauton.

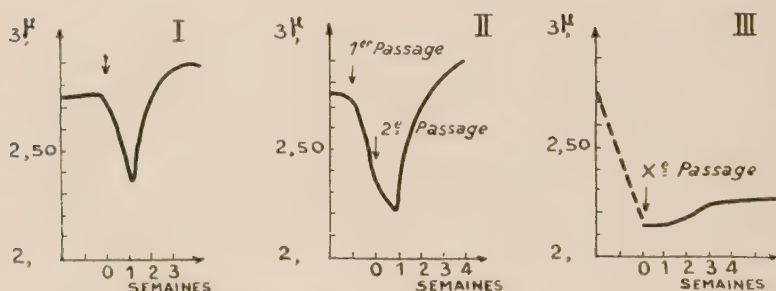


FIG. 1. — I, premier passage sur Sauton : augmentation de taille par vieillissement après diminution pendant la 1^{re} semaine; II, 2^e passage sur Sauton : augmentation de taille par vieillissement après diminution pendant la 1^{re} semaine; III, x^e passage sur Sauton : plus d'augmentation de taille.

Donc, après un certain nombre de passages sur milieu de Sauton, les germes composant les cultures BCG perdent cette faculté de grandir et restent de petite taille.

Il nous a paru intéressant de vérifier si cette incapacité de grandir se maintient quand on réensemence sur pomme de terre ces cultures BCG, entretenues pendant des mois sur le seul milieu de Sauton.

Nous avons donc réensemencé une de ces cultures, entretenue pendant dix-huit mois sur milieu de Sauton, sur pomme de terre au Sauton et nous avons fait un deuxième passage de cette dernière sur une nouvelle pomme de terre; en pratiquant les mensurations sur les bacilles composant cette culture de *deuxième passage sur pomme de terre*, nous avons trouvé, comme longueur moyenne de ces germes à l'âge de quinze jours, $2,127 \mu$.

Cela semble montrer que le raccourcissement des bacilles qui se produit dans les cultures entretenues uniquement par réensemencements en série sur milieu de Sauton se maintient, même quand on remet ces cultures sur le milieu normal d'entretien qu'est la pomme de terre, c'est-à-dire que nous sommes en pré-

sence d'une propriété nouvelle, se transmettant au moins au cours des premiers réensemencements successifs sur milieu normal.

Ayant fait cette constatation, nous avons eu alors la curiosité d'examiner une suspension vaccinale de BCG préparée à l'Institut sérothérapique de Copenhague, où la souche BCG a été entretenue pendant de longues années sur le milieu de Sauton.

Il s'agit du vaccin n° 872, destiné à la vaccination par voie intradermique qui nous fut obligeamment procuré par la Station Pilote de Paris.

Nous avons préparé des frottis de ce vaccin danois colorés au Ziehl, et nous avons mesuré, comme d'habitude, 600 bacilles sur ces frottis. Nous avons ainsi trouvé que la taille moyenne des germes composant ce *vaccin danois* était de 2,105 μ .

Des mensurations des germes composant un vaccin BCG de l'Institut Pasteur, n° 983, destiné lui aussi à la vaccination par voie intradermique, nous ont donné, comme taille moyenne des bacilles, 3,114 μ .

On voit la différence notable entre la taille moyenne des bacilles composant le vaccin danois et ceux du vaccin français.

Cette différence devient encore plus considérable quand on compare les cultures obtenues par l'ensemencement de ces deux vaccins sur milieu de Lœwenstein-Jensen.

La culture Lœwenstein issue du vaccin danois, âgée de quarante jours, est composée de bacilles mesurant en moyenne 1,380 μ , celle due à l'ensemencement du vaccin français (culture de quarante jours également) montre, comme longueur moyenne des germes, 2,698 μ .

Cette différence du simple au double frappe immédiatement à l'examen microscopique.

Le pourcentage de répartition des différentes tailles des germes composant ces deux vaccins et les cultures Lœwenstein issues de leur ensemencement sur ce milieu est indiqué par les courbes de la figure 2.

Nous avons répété ces mensurations sur un autre lot de vaccin danois (n° 875), et nous avons obtenu des résultats tout à fait analogues.

L'ensemencement de ce dernier vaccin danois sur pomme de terre a donné des cultures composées de bacilles mesurant en moyenne 1,969 μ à l'âge de dix-huit jours.

La seule explication de cette différence entre les germes composant le vaccin danois et ceux du vaccin français, en ce qui concerne leur taille moyenne, doit être, à notre avis, la différence entre la technique d'entretien de la souche BCG telle qu'elle est pratiquée à Copenhague et celle suivie à Paris. Il semble, en effet, ressortir de cette étude qu'il est possible, par des réensemencements en série de la souche BCG sur milieu de Sauton,

de modifier la taille moyenne des bacilles BCG, modification qui se maintient même quand les bacilles retrouvent leur milieu préféré de culture, au moins au cours des premiers passages.

Cette constatation n'a pas qu'un intérêt théorique. Elle a une grande importance pour la pratique de la vaccination au BCG, car il est évident qu'un vaccin BCG dosé par exemple au 1/10 de milligramme, et composé de bacilles mesurant en moyenne 3,114 μ , n'aura pas la même activité qu'un vaccin ayant la même concentration pondérale, mais dont les bacilles qui le composent ne mesurent que 2,105 μ .

M. Giuntini ayant bien voulu examiner ces vaccins danois et français au microscope électronique, il est apparu que les bacilles

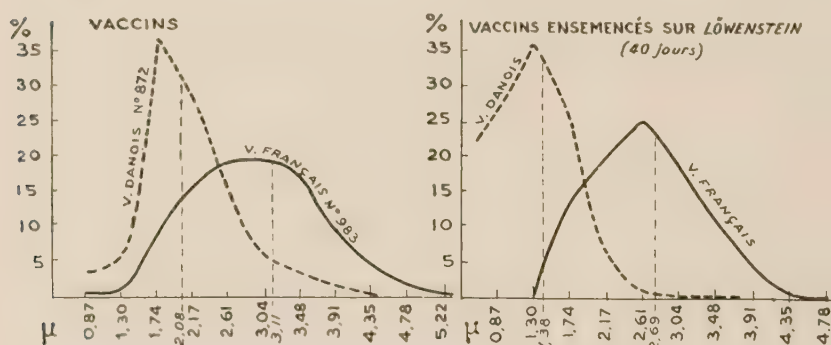


FIG. 2. — Taille des bacilles sur les frottis (pourcentages de répartition).

du vaccin danois n'ont pas seulement en moyenne 2/3 de la longueur des germes du vaccin BCG français, mais qu'une différence de même ordre existe entre l'épaisseur des deux sortes de bacilles. La diminution de taille jouant sur trois dimensions, nous pouvons dire que pour un même poids, le vaccin danois que nous avons examiné contient environ trois fois plus de germes que le vaccin français. En supposant que les germes ont, par ailleurs, les mêmes propriétés de virulence et de vitalité, il est évident qu'un tel vaccin BCG, dosé à 0,1 mg., équivaut, en ce qui concerne la richesse en bacilles, à un vaccin français qui serait dosé à 0,3 mg. Or, nous savons que cette dernière dose dépasse assez considérablement la limite de ce qu'on peut injecter de BCG dans le derme sans risquer des réactions locales et ganglionnaires désagréables.

Il nous a semblé utile d'exposer ici ces constatations *in extenso* vu l'importance des campagnes de vaccination au BCG organisées aujourd'hui par l'U. N. I. C. E. F., et la tendance actuelle à la

standardisation des doses de vaccin et des méthodes de vaccination. Il serait à souhaiter que tous les vaccins BCG utilisés dans le monde, soient préparés à partir d'une culture BCG n'ayant pas subi de modifications consécutives à un mode d'entretien aberrant.

**ANTIBIOTIQUES ACTIFS, *IN VITRO*,
A DES DILUTIONS QUASI HOMÉOPATHIQUES
(ACIDES GRAS DE L'HUILE DE FOIE DE MORUE,
FORMES HYPERACTIVES DU P.A.S.
ET DE LA STREPTOMYCINE)**

par J. SOLOMIDÈS.

(Institut Pasteur. Laboratoires de Recherches sur la Tuberculose.)

Quand, il y a quelques années, il a été bien établi que la pénicilline était capable d'inhiber le développement du staphylocoque à des taux de l'ordre de 10^{-8} , on a pensé, et à juste raison, que c'étaient là des taux de dilution difficiles à dépasser. Cependant, dans ces dernières années, nous avons pu étudier trois antibiotiques dont les taux bactériostatiques vis-à-vis de certains microbes dépassent largement le taux actif de la pénicilline et se rapprochent des dilutions employées pour certains médicaments par les médecins homéopathes. Il nous a semblé intéressant de grouper, dans ce mémoire, tous les faits relatifs à leur activité bactériostatique, faits qui ont déjà fait l'objet de plusieurs communications, en insistant tout particulièrement sur la streptomycine.

A. ACIDES GRAS DE L'HUILE DE FOIE DE MORUE. — C'est en 1947 que nous avons montré, avec A. Hirsch, que les acides gras de cette huile étaient fortement bactériostatiques pour certains germes tels que le staphylocoque [1 a], le streptocoque et le pneumocoque [1 b]. En ce qui concerne le premier de ces germes (le staphylocoque), ces acides ne se sont montrés actifs qu'à des dilutions relativement faibles (à 10^{-6} environ) et seulement en présence d'alcool et d'acétone à 1/30 ou 1/50 dans le bouillon ordinaire. De même, le bacille tuberculeux s'est montré peu sensible à l'action de ces acides, et les voiles tuberculeux sur bouillon glycérimé n'ont pu être inhibés par ces corps qu'à des dilutions de 10^{-4} . Par contre, les émulsions aqueuses savonneuses de ces acides se sont montrées autrement plus actives vis-à-vis du streptocoque et du pneumocoque, puisque l'inhibition du développement de ces germes peut être obtenue à des taux de dilution de

10^{-9} pour le premier de ces germes (le streptocoque) et de 10^{-10} pour le second (le pneumocoque) [1 c].

Cependant, ces taux bactériostatiques ne peuvent être obtenus que dans certaines conditions optima, sur lesquelles nous allons brièvement insister.

a) Les émulsions savonneuses des acides gras de l'huile de foie de morue présentent leur maximum d'activité à certains pH, qu'on peut situer aux environs de 8,5 à 9 pour des concentrations de 1/10 d'acides. Les émulsions plus diluées sont notablement moins actives.

b) Les titrages doivent être effectués en bouillon ordinaire, glucosé ou non. En eau peptonée, l'activité de ces émulsions est à peu près nulle [2 a].

c) La présence de sérum ou de jaune d'œuf (phospholipides) dans le bouillon neutralise à peu près entièrement l'activité de ces savons.

d) Le blocage par estérification de leur fonction acide fait perdre aux acides gras de l'huile de foie de morue la plus grande partie de leur pouvoir bactériostatique [2 b].

e) Par contre, la combinaison de ces acides gras avec certaines bases organiques, telles que l'aniline ou la pyridine, ne leur fait perdre que partiellement l'activité antistreptococcique ; mais on arrive ainsi à stabiliser le pouvoir bactériostatique de ces corps, de sorte que n'importe laquelle de leurs dilutions dans l'eau, titrée en eau peptonée ou en bouillon ordinaire, présente la même activité antibactérienne, ce qui n'est pas le cas pour les savons alcalins de ces mêmes acides [2 a].

D'autre part, ces faits nous autorisent à penser que l'aniline ou la pyridine forment, avec ces acides gras, des savons plus stables et moins hydrolysables en solution aqueuse diluée que les savons alcalins de ces mêmes acides. C'est, en effet, par l'hydrolyse des savons alcalins et la formation d'acides gras insolubles et inactifs qu'on peut rendre compte, à notre avis, de la plupart des faits que nous venons de rapporter [2]. Enfin, l'inhibition de l'action antibactérienne des acides gras de l'huile de foie de morue par le sérum pourrait signifier que ces substances agissent sur les microbes par simple diminution de la tension superficielle du milieu de culture dans lequel ils se trouvent. Or, s'il en était ainsi, d'autres substances tensio-actives, telles que la lécithine et le milieu de Besredka qui en contient, devraient pouvoir renforcer l'activité bactériostatique des acides gras de l'huile de foie de morue en diminuant encore davantage la tension superficielle du milieu. Or, nous avons montré qu'il n'en est rien pour le milieu de Besredka, et des expériences assez récentes, dues à Alexander et Soltys [3] montrent qu'on peut raisonnablement considérer les modifications de la tension superficielle du milieu contenant des

substances tensio-actives antibiotiques comme la conséquence plutôt que comme la cause même de leur action antibactérienne. En effet, ces auteurs, mesurant la tension superficielle des milieux de culture ensemencés avec des microbes acido-résistants et contenant diverses substances tensio-actives, dont l'acide oléique, qui fait partie des acides gras de l'huile de foie de morue, trouvent que la tension superficielle varie avec le temps et que, faible au début, elle s'élève par la suite, ce qui montrerait, d'après ces auteurs, que la substance antibiotique et tensio-active est adsorbée par la surface des microbes. D'après ces mêmes auteurs, la diminution de la tension superficielle par les substances tensio-actives favoriserait leur propre adsorption par les microbes et l'action inhibitrice de la gélose contre l'action anti-microbienne de ces substances pourrait être due à une combinaison de ces corps tensio-actifs, non plus avec les microbes, mais avec la gélose. A la lumière de ces travaux, on peut conclure que les acides gras de l'huile de foie de morue sont adsorbés par les microbes sensibles dont ils inhibent la croissance ou même provoquent la lyse [4 c], mais que cette adsorption n'a pas lieu en présence de grosses molécules colloïdales (protéines sériques, phospholipides), l'adsorption se faisant, dans ce dernier cas, entre acides gras et molécules colloïdales. Par ailleurs, c'est cet effet protecteur des protéines sériques contre les effets toxiques des acides gras que Dubos [4] a mis à profit pour préparer un milieu de culture dans lequel le bacille tuberculeux pousse en profondeur.

En résumé, pourvu que l'on opère dans des conditions telles que l'hydrolyse ou l'adsorption colloïdale des savons des acides gras de l'huile de foie de morue soient réduites au minimum, ces corps sont capables d'inhiber le développement du pneumocoque et du streptocoque à des dilutions de l'ordre de 10^{-10} et de 10^{-9} respectivement.

B. FORMES HYPERACTIVES DU P.A.S. — Nous avons déjà signalé que le P. A. S. en solution concentrée se montre beaucoup plus actif vis-à-vis du bacille tuberculeux que le même corps en solution diluée [5 a]. Nous avons effectué nos titrages en milieu de Sauton additionné de sérum de cheval à 1/30, suivant une technique que nous avons déjà rapportée en détail [6]. Contentons-nous de préciser que les ensemencements ont été faits avec 0,01 mg. de bacilles tuberculeux humains ou bovins et les résultats enregistrés après quatorze jours d'étuve.

Dès nos premières expériences, il nous est apparu nettement que le P. A. S. peu hydraté (en solution concentrée à 1/5 ou 1/3) était beaucoup plus tuberculostatique que le P. A. S. considérablement hydraté (solutions à 1/300 et à 1/500), puisque le premier (en solution concentrée) s'était montré actif à des taux de l'ordre

de $1/2,5.10^{-9}$, alors que le second (en solution diluée), titré dans les mêmes conditions, ne s'est montré actif qu'à des taux notablement inférieurs (à 10^{-7}).

Depuis, nous avons confirmé ces résultats, et nous sommes à même d'apporter les précisions suivantes :

a) Les solutions concentrées du P. A. S. sont d'autant plus actives qu'elles sont préparées de fraîche date et que leur stérilisation n'a pas été obtenue par la chaleur (à l'autoclave), mais par auto-stérilisation après séjour de vingt-quatre heures à la température du laboratoire.

b) Par dilution des solutions concentrées dans l'eau, il y a diminution du pouvoir tuberculostatique des solutions concentrées ; mais cette diminution n'est pas instantanée, mais progressive pendant vingt-quatre à quarante-huit heures. Elle est très faible si le titrage est fait immédiatement après dilution dans l'eau distillée stérile. Elle est déjà beaucoup plus prononcée une demi-heure ou une heure plus tard. On fait ces titrages parallèlement et en même temps que les titrages des solutions mères concentrées. Il en résulte donc qu'il existe des formes hyperactives de P. A. S. (en solution concentrée) hydrolabiles en présence d'un excès d'eau. Nous en discuterons plus loin de leur nature.

C. FORMES HYPERACTIVES DE LA STREPTOMYCINE. — Tout récemment, nous avons constaté des faits analogues avec la streptomycine. Des solutions aqueuses de cet antibiotique à $1/10$ ou $1/1.000$ (parfois à $1/5$ ou $1/100$) ont été conservées au frigidaire, puis titrées, à des délais variables, en général tous les six jours environ, pendant plus de six mois. Nous avons effectué ces titrages, soit en milieu de Sauton additionné de sérum de cheval à $1/30$, suivant la technique dont nous avons parlé plus haut à propos du P. A. S., soit en milieu de Dubos, soit dans les deux milieux à la fois. Comme pour le P. A. S., nous avons effectué nos dilutions en série dans le milieu de culture même, sans avoir recours à d'autres solutions aqueuses de streptomycine que les solutions initiales à $1/10$ ou $1/1.000$. Chaque fois, pour chacune des solutions titrées (à $1/10$ et à $1/1.000$ de streptomycine), nous avons réalisé à peu près les mêmes taux de dilution dans le même milieu de culture (Dubos ou Sauton au sérum) et ensémenché tous les tubes, y compris les tubes témoins ne contenant pas d'antibiotique avec $0,1 \text{ cm}^3$ d'une suspension bacillaire contenant $0,01 \text{ mg.}$ d'une culture de bacilles tuberculeux sur pomme de terre, âgée de moins d'un mois.

Ainsi, en effectuant les titrages des solutions concentrées à $1/10$, et des solutions diluées à $1/1.000$ de streptomycine, à peu près simultanément et dans les mêmes conditions, nous avons pu constater, après quatorze jours d'étuve, que les solutions

concentrées de streptomycine étaient actives à des taux considérables, de l'ordre de 10^{-11} ou même de 10^{-12} . Il nous a paru que les taux tuberculostatiques étaient d'autant plus élevés que les tubes contenant le milieu de culture étaient plus propres et, autant que possible, neufs, n'ayant jamais servi. Même en prenant ces précautions, on observe une certaine variabilité dans les résultats. C'est ainsi qu'en faisant le même titrage à partir du même échantillon de streptomycine à 1/10, quatre fois de suite et dans les mêmes conditions, on obtient des résultats variant entre 10^{-11} , 10^{-12} et même parfois 10^{-13} . Par contre, les solutions diluées à 1/1.000 du même antibiotique, préparées de fraîche date, n'arrivaient à inhiber le bacille tuberculeux qu'à des dilutions de l'ordre de 10^{-9} , pour baisser, par la suite, après un séjour au frigidaire de trois à cinq mois, à des taux de 10^{-7} ou 10^{-8} .

Ces essais ont été effectués principalement avec une souche humaine virulente (Knack.), puis confirmés avec une autre souche humaine virulente (Lern.) et une souche bovine virulente (Dupré S.). De même, nous avons titré plusieurs échantillons de streptomycine sans constater aucune différence appréciable dans les résultats. Il est à noter que des essais analogues ont été effectués avec le colibacille en bouillon ordinaire additionné ou non de sérum de cheval à 1/30, sans observer aucune différence appréciable entre les pouvoirs bactériostatiques des solutions diluées (à 1/100) ou concentrées (à 1/10) de streptomycine.

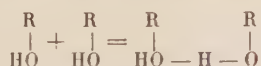
DISCUSSION. — Nous avons étudié successivement trois antibiotiques de constitution chimique et d'origine très différentes. Tous les trois se sont montrés capables d'inhiber le développement de certains microbes à des dilutions égales ou nettement supérieures à 10^{-9} . Cependant, ce pouvoir anti-microbien à des dilutions quasi homéopathiques ne se manifeste que dans certaines conditions, dont la principale, commune à tous les trois, est la concentration initiale en principe actif de la solution titrée, concentration qui doit être égale ou plus forte que 1/10.

En ce qui concerne les savons alcalins des acides gras de l'huile de foie de morue, nous avons déjà fait observer que la perte d'activité antimicrobienne de leurs solutions concentrées, dès que celles-ci se trouvent diluées dans un excès d'eau, pourrait être expliquée par les lois de l'hydrolyse, puisqu'il s'agit d'acides faibles combinés à une base forte dans un excès d'eau. Pourrait-on retenir la même explication pour le cas du P. A. S. et de la streptomycine? Sans l'éliminer complètement, une autre hypothèse de travail nous a paru rendre mieux compte des faits.

Il nous a, en effet, semblé que l'hydrolyse qui se produit dans le cas du P. A. S. et de la streptomycine est une hydrolyse de corps polymérisés, analogue à celle de la glycérine, telle que

nous l'avons décrite depuis plusieurs années [7]. D'après ces recherches, la toxicité de la glycérine pour les cellules animales, et en particulier pour les globules rouges, est fonction de sa teneur en eau. Extrêmement toxique à l'état pur pour le lapin, dont elle occasionne la mort en quelques jours à des doses relativement faibles (1,25 g. par kilogramme de poids vif et par voie intraveineuse), elle perd à peu près toute toxicité par dilution dans l'eau. Cependant, comme le P. A. S. vis-à-vis du bacille tuberculeux, la glycérine diluée dans le sérum conserve toute sa toxicité pour le lapin et tout son pouvoir hémolytique pour les globules rouges du lapin ou du mouton. Or, on admet que les molécules de la glycérine, comme celles de tous les alcools, ont tendance à s'associer ou se polymériser, grâce à leur fonction oxhydryle, et se dépolymériser dans l'eau; ceci nous a amené à admettre que la grande toxicité de la glycérine non hydratée était due à sa molécule polymérisée qui pouvait, de ce fait, s'associer aux protéines sériques pour former des complexes toxiques pour les cellules animales.

Retenons donc qu'au point de vue physiologique, les deux phénomènes, perte de toxicité pour les cellules animales de la glycérine fortement hydratée et perte relative de toxicité pour les cellules bacillaires du P. A. S. ou de la streptomycine fortement hydratée (en solution diluée à 1/500 ou 1/1.000), présentent une certaine analogie ou ressemblance. Cette analogie devient encore plus frappante si l'on tient compte du fait que P. A. S. et streptomycine présentent aussi, dans leur molécule, des groupements oxhydryles et si l'on admet avec R. Lefaux [8] que les molécules de tous les corps oxhydrylés peuvent s'associer par des liaisons hydrogènes pour former des polymères suivant la formule :



Quoi qu'il en soit, si l'existence de formes hyperactives de savons des acides gras de l'huile de foie de morue n'a aucune importance pratique, puisque leur pouvoir bactériostatique est entièrement neutralisé par le sérum sanguin et que ces corps se montrent, de ce fait, entièrement inactifs *in vivo*, il ne semble pas qu'il en soit ainsi pour le P. A. S. et la streptomycine. En effet, en ce qui concerne le P. A. S., nous avons pu montrer expérimentalement, chez le cobaye tuberculeux, que ses formes hyperactives (solutions à 1/5) étaient fortement tuberculostatiques à des doses relativement faibles (0,10 g. par jour pendant un mois) [5 b].

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS. — Trois antibiotiques de constitution chimique et d'origine différentes ont été étudiés et trouvés

capables d'inhiber le développement de certains microbes à des dilutions quasi homéopathiques, égales ou supérieures à 10^{-9} . Ce sont les savons des acides gras de l'huile de foie de morue qui inhibent le développement du streptocoque et du pneumocoque à des taux de l'ordre de 10^{-9} et 10^{-10} respectivement, le P. A. S. et la streptomycine qui se montrent tuberculostatiques à des taux de l'ordre de $1/2,5.10^{-9}$ et 10^{-11} respectivement. Cependant, cette activité bactériostatique considérable ne peut être mise en évidence que dans certaines conditions dont la principale, commune à tous les trois, est la concentration initiale en principe actif de la solution titrée, concentration qui doit être égale ou plus forte que 1/10. L'hydrolabilité des principes actifs contenus dans ces solutions a été admise et des hypothèses émises en ce qui concerne leur hydrolyse.

Notice. — Depuis la rédaction de ce mémoire, nous avons pris connaissance d'un travail de Feldman, Karlson et Hinshaw (Parenteral administration of *p*-aminosalicylic acid [P. A. S.] in experimental tuberculosis. *Proceed. of the Staff Meetings of the Mayo Clinic*, 1949, **24**, 220) qui complète et confirme nos propres travaux sur le P. A. S. En effet, ces auteurs, qui ont administré à des cobayes tuberculeux du P. A. S. en solution concentrée (25 p. 100) et par voie sous-cutanée, ont pu conclure que l'action thérapeutique du P. A. S. sur l'infection tuberculeuse était impressionnante et que d'autres recherches concernant l'administration parentérale de ce produit étaient souhaitables.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] SOLOMIDÈS (J.) et HIRSCH (A.). a) *Ces Annales*, 1947, **73**, 819 ; b) *Ces Annales*, 1947, **73**, 904 ; c) *C. R. Soc. Biol.*, 1947, **141**, 328.
- [2] SOLOMIDÈS (J.). a) *Ces Annales*, 1948, **74**, 72 ; b) *ibid.*, 1948, **74**, 328.
- [3] ALEXANDER et SOLTYS. *J. Path. a. Bact.*, 1946, **58**, 37.
- [4] DUBOS et DAVIS (B.). *J. exp. Med.*, 1946, **83**, 409.
- [5] SOLOMIDÈS (J.) et BOURLAND (E.). a) *Ces Annales*, 1949, **76**, 245. *C. R. Soc. Biol.*, 1949, **143**, 181 ; b) *Ces Annales*, 1949, **77**, 310. *C. R. Soc. Biol.*, 1949, **143**, 836.
- [6] SOLOMIDÈS (J.). *Ces Annales*, 1949, **76**, 371.
- [7] SOLOMIDÈS (J.). *C. R. Soc. Biol.*, 1939, **131**, 928 ; 1939, **132**, 359 ; 1945, **139**, 10, 281, 542, 871 et 873. *Rev. Tub.*, 1939, **5**, 1248.
- [8] LEFAUX (R.). *Prod. Pharmaceut.*, 1948, **3**, 439.

DES CONDITIONS D'ACTION DES SUBSTANCES DITES « SUPERFICIELLEMENT ACTIVES » SUR LES MICROORGANISMES

par D. G. DERVICHIAN (*).

(Institut Pasteur. Service de Chimie physique.)

Il est hors de doute que certains phénomènes, certains processus, sont spécifiques de la matière vivante et qu'ils la caractérisent. Mais bien d'autres phénomènes peuvent avoir pour siège l'intérieur d'un organisme ou mieux encore, le milieu dans lequel il baigne, qui ne sont que les conséquences banales de propriétés ou la simple répétition de faits physico-chimiques bien établis. Cette remarque pourrait sembler superflue. Mais on ne peut parcourir les publications relatives aux actions bactériostatique, bactéricide ou hémolytique des produits anioniques ou cationiques actifs (détergents, agents mouillants, moussants, émulsionnants), sans être frappé par les efforts déployés par certains auteurs pour interpréter des particularités dont certaines ne sont déroutantes qu'en apparence et dont beaucoup sont prévisibles du point de vue purement physico-chimique.

Certes, les mécanismes intimes de l'action sur le métabolisme ou de l'arrêt dans la multiplication, sont spécifiquement biologiques et leur connaissance est loin d'être acquise. Mais beaucoup des détails observés dans les modes d'action ne sont que les conséquences immédiates, soit des conditions connues des interactions de tous les ions inorganiques ou organiques même les plus banaux avec les protéines et les autres substances biochimiques ioniques, soit du comportement plus particulier de ces substances dites « superficiellement actives » vis-à-vis des protéines, des lipides et stériles ioniques ou non ioniques.

Le but de cet exposé est de présenter certaines des particularités observées dans l'action bactériostatique, bactéricide ou hémolytante des substances anioniques ou cationiques actives à la lumière de nos connaissances sur les propriétés plus générales de ces mêmes substances. En même temps, nous essaierons d'éliminer certaines erreurs profondément enracinées.

(*) *Société Française de Microbiologie*, séance du 5 janvier 1950.

I. — REMARQUES SUR LES PHÉNOMÈNES DE SURFACE
ET SUR LES MEMBRANES.

La plus commune de ces erreurs a été répandue par certains spécialistes des substances mouillantes, émulsionnantes ou moussantes. Elle consiste à confondre un effet avec une cause et à prétendre que ces substances, dissoutes dans l'eau, favorisent le mouillage, l'émulsification ou le moussage, parce qu'elles abaissent la tension superficielle de l'eau ou la tension interfaciale eau-huile. Il n'en est rien. Qu'il suffise de dire simplement ici que les propriétés de mousser et de mouiller sont, à strictement parler, incompatibles (qu'un bon mouillant est un mauvais moussant ou émulsionnant, et réciproquement), alors que ces divers types de corps abaissent la tension superficielle de l'eau. Or, des propriétés incompatibles entre elles ne peuvent être attribuées à la même cause. De plus, il n'existe aucune corrélation entre l'importance de cet abaissement de la tension superficielle et, non seulement le type de propriété recherché (mouillant, émulsionnant, moussant), mais même l'intensité de chacune de ces propriétés.

De cette interprétation fausse est né le terme de « substance tensio-active », qui est d'autant plus à exclure que son simple usage est déjà une interprétation admise *a priori*. Une des conséquences néfastes de l'emploi de ce terme est le rapprochement que l'on fait parfois entre l'abaissement de la tension superficielle provoquée par ces corps et leur action hémolysante ou même bactéricide. D'abord, il ne pourrait s'agir que de tension interfaciale, puisque les micro-organismes sont immergés. Ensuite, il ne faut pas perdre de vue que la surface de la bactérie (qui souvent n'est pas définie), ne sépare pas un milieu aqueux d'un milieu huileux, mais deux milieux aqueux. La tension interfaciale, si cela a un sens d'en parler, doit être très faible. La tension interfaciale entre deux phases aqueuses juxtaposées a été effectivement mesurée par Bungenberg de Jong et de Ruitter [1], dans le cas du coacervat de gélatine et de gomme arabique qui peut être dispersé en gouttelettes au sein d'une solution aqueuse beaucoup plus diluée. Elle est inférieure à 0,0025 dyne/cm. On ne voit donc pas quel abaissement de la tension pourrait encore produire l'agent actif.

Il n'y a pas non plus de corrélation entre la tension superficielle ou interfaciale de la solution aqueuse de certaines substances et leur action lysante ou bactériostatique. Des composés non-ioniques, tels que, par exemple, les produits de condensation d'un alcool à chaîne longue avec l'oxyde d'éthylène polymérisé, ou tels que les Tweens, n'ont pas d'action lytique sur les globules rouges ou inhibitrice sur la croissance microbienne. Cependant, ces substances abaissent la tension superficielle de l'eau et la tension inter-

faciale eau-huile d'une façon comparable à ce que font des composés anioniques ou cationiques, lesquels produisent la lyse des globules rouges et ont une action bactériostatique.

En réalité, lorsque l'on ajoute un agent mouillant, moussant ou émulsionnant à l'eau, la substance active s'adsorbe soit à l'interface eau-huile, soit à la surface de l'eau, et c'est l'état de cette couche, lequel dépend de la constitution de la substance, qui conditionne la mouillabilité, le moussage ou l'émulsification. Corrélativement, du fait de la présence de la couche adsorbée, la tension superficielle ou interfaciale se trouve abaissée [2]. On peut donc, à la rigueur, appeler ces agents des « substances superficiellement actives », puisqu'elles s'adsorbent sur les surfaces de séparation eau-huile ou eau-air. Mais c'est là une de leurs propriétés qui tient à la structure particulière de leurs molécules.

Au lieu de faire intervenir la tension superficielle, beaucoup d'auteurs envisagent l'adsorption de ces substances « superficiellement actives » à la surface des micro-organismes. Ainsi que nous l'avons dit, il est difficile d'envisager la surface d'une cellule comme s'il s'agissait de l'interface entre l'huile et l'eau. Mais on invoque alors la présence d'une membrane qui peut être lipidique. Il est utile de faire ici une digression. S'il est vrai que le micro-organisme peut avoir une membrane, celle-ci n'est encore qu'une phase aqueuse, peut-être plus concentrée. Si la « membrane » est plus riche en lipides, les molécules de ceux-ci ne peuvent être orientées qu'avec leur groupement hydrosoluble vers l'eau. Il en est de même si la région superficielle est purement protéique. Or, il y a de l'eau aussi bien à l'intérieur qu'à l'extérieur. La membrane la plus idéalisée se présentera donc avec la structure lamellaire à doubles feuillet, que l'on trouve, par exemple, dans les formations myéliniques [3]. On sait que dans de telles formations, des couches d'eau et des doubles feuillets de molécules lipidiques alternent. Dans chacun des doubles feuillets, les molécules lipidiques sont orientées, tournant leurs groupes hydrosolubles vers chacune des couches d'eau adjacentes et dissimulant leurs fonctions hydrocarbonées entre elles. (Des solutions relativement concentrées de protéines, présenteraient une structure similaire.)

Que la membrane soit constituée d'un seul double feuillet ou de l'empilement d'un certain nombre de feuillets élémentaires, on ne saurait considérer une telle couche symétrique de la même façon que l'interface d'une gouttelette d'huile émulsionnée dans l'eau ; on ne peut pas parler de la tension interfaciale, ni envisager son abaissement par adsorption *sur* elle des molécules de l'agent actif. Mais, ce que peuvent faire les molécules de l'agent actif, c'est de pénétrer *dans* l'édifice même des couches, de s'associer avec des constituants lipidiques, stéroliques ou autres dont elles sont formées pour donner naissance à de nouvelles associations molé-

culaires présentant plus d'affinité pour l'eau et se dispersant. Ainsi, la membrane serait dissociée. Bien que tous ces faits soient connus en ce qui concerne des systèmes artificiels [4], nous ne possédons aucun renseignement précis, ni sur la structure des membranes des micro-organismes, ni sur leur comportement. La digression qui a été faite au sujet de la surface des cellules n'a eu pour but que d'opposer des hypothèses beaucoup plus plausibles à celles que l'on fait implicitement ou explicitement lorsque l'on invoque des phénomènes d'adsorption à la surface des micro-organismes.

Un fait d'expérience semble d'ailleurs infirmer l'hypothèse d'une action par simple adsorption à la surface du micro-organisme. Dans une étude quantitative de l'hémolyse par l'acide laurique à différents pH, il a été possible de déterminer les quantités d'acide laurique immobilisées par chaque globule rouge [5]. Or, il n'existe pas de relation entre l'aire superficielle des globules et la quantité d'acide laurique fixée. Non seulement cette quantité est supérieure à celle qu'il faudrait pour constituer une seule couche monomoléculaire adsorbée à la surface des globules, mais encore elle varie suivant la valeur du pH. Il se fixe au moins trois fois plus d'acide laurique à pH 5,8 qu'à pH 8,1.

Que l'action des substances actives s'exerce *dans* la membrane ou à l'intérieur de la cellule, leurs réactivités vis-à-vis des divers constituants de la cellule est à considérer. Comment les anions et les cations actifs réagissent-ils ou s'associent-ils avec des substances du même type que celles que l'on rencontre dans les micro-organismes ? Les modalités de ces interactions se retrouvent-elles dans les conditions d'action sur les micro-organismes ? Nous allons essayer de répondre à ces deux questions.

II. — INTERACTIONS ENTRE DÉTERSIFS ET LIPIDES OU STÉRIDES ET MODES D'ACTION SUR LES MICRO-ORGANISMES.

Si l'on ajoute un sel de calcium dans la solution du sel alcalin d'un acide gras, celui-ci est éliminé de la solution, car les sels de calcium des acides gras sont insolubles dans l'eau. Si donc, ayant constaté que certains acides gras sont bactériostatiques pour certains micro-organismes, on répète les expériences en présence d'un sel de calcium, on doit s'attendre à ne plus observer d'effet puisque l'acide gras est éliminé du milieu. Cette remarque peut sembler évidente et superflue, mais elle est en fait nécessaire, car Pion Ca^{++} a été signalé comme inhibiteur des acides gras [6].

Les faits semblent moins évidents *a priori* lorsqu'il s'agit d'autres substances dites « inhibitrices ». On sait depuis longtemps que les substances du type des anions et des cations actifs s'associent avec des composés hydro-carbonés insolubles, tels

que les glycérides, les alcools à chaîne longue, les phospholipides, le cholestérol et d'autres stérides pour se séparer en des phases plus ou moins gonflées, anisotropes ou isotropes ou se disperser en micelles mixtes. Les conditions de formation et la structure d'un grand nombre de telles associations ont été étudiées [4]. Ces phases, bien que représentant en somme des solutions aqueuses (isotropes ou anisotropes), restent en équilibre avec un excès d'eau sans se dissocier. Les constituants ioniques qu'elles renferment se trouvent donc immobilisés, à moins que l'addition d'une autre substance du même type ne vienne rompre l'équilibre ou ne donne lieu à une libération par substitution. Du fait de leur structure, ces associations se font le plus souvent suivant des proportions définies.

Si donc, au moment de son introduction dans le milieu de culture microbienne, un agent normalement actif est additionné à du cholestérol, tout se passera comme s'il était rendu insoluble et qu'en définitive on n'avait rien introduit. On dira du cholestérol, ou des autres substances que l'on a associées à l'agent actif, que ce sont des « inhibiteurs ».

Delezenne et Fourneau [7] avaient montré, il y a longtemps, que le cholestérol inhibait l'action hémolytique de la lysoctithine et que les deux substances s'associaient pour donner ce qu'ils appelaient une « émulsion très stable ». De telles associations entre le cholestérol et différents esters à chaîne longue de la choline ont été étudiées aussi par Baranger [8]. Dans cette série des esters de la choline, l'association avec le cholestérol (formation d'« émulsion ») ne se fait qu'à partir du terme ayant au moins 10 atomes de carbone dans la chaîne. La même longueur de chaîne est aussi nécessaire pour que la substance soit hémolytique.

Il n'est pas trop hasardeux de suggérer que, dans le mécanisme de l'hémolyse ou dans certains cas d'action bactériostatique ou bactéricide, des associations similaires sont réalisées dans la membrane ou à l'intérieur du micro-organisme, entre le détersif et les lipides ou stérides qui s'y trouvent à l'état déjà plus ou moins associé. On peut même penser que le détersif, soit s'additionne, soit se substitue à certains lipides ou stérides dans l'association préexistante ou, au contraire, la dissocie. L'hypothèse est d'autant plus vraisemblable que de telles substitutions (dont certaines, spécifiques), ont été mises en évidence par Machébeuf et Tayeau [9] dans les associations lipo-protéiques (cénapses) du sérum sanguin et que des phénomènes rappelant étonnamment celui de l'hémolyse ont été reproduits par Dervichian et Magnant [10] en faisant agir des substances réputées hémolytiques sur des gouttelettes de coacervats contenant de l'hémoglobine associée à de l'acide nucléique et des lipides.

Ainsi, ajouter du cholestérol ou un phospholipide au détersif

au moment de son introduction dans un milieu de culture ou dans une suspension de globule rouge revient à l'immobiliser dans une association qui est peut-être du même type que celle qu'il réaliserait aux dépens du micro-organisme s'il n'était accaparé à l'avance. On peut d'ailleurs imaginer toutes les variantes et combinaisons possibles. Par exemple [41], on peut ajouter de la lécithine au cholestérol et constater que celui-ci, étant ainsi immobilisé par la lécithine, ne peut plus agir comme « antagoniste » vis-à-vis de l'agent hémolytique.

Baker, Harrison et Miller [42] ont montré que les actions bactériostatiques et bactéricides, aussi bien des anions que des cations actifs, étaient inhibées par l'addition de phospholipides dans le milieu de culture. Les phospholipides doivent être ajoutés soit avant le détersif, soit simultanément. L'action « protectrice » des phospholipides se manifeste même si les bactéries ont été lavées après avoir été mises en contact avec eux. Nous remarquons aussi que l'action antagoniste est indépendante de la charge ionique du détersif. Ceci, ainsi que le fait que l'addition subséquente des phospholipides n'a pas d'action antagoniste, s'explique, à la lumière de nos connaissances, sur les conditions de formation des associations moléculaires de ces mêmes substances avec les différents composés à chaîne longue.

En effet, ces associations se font surtout par « syncrystallisation » [43] des parties hydrocarbonées des deux espèces de molécules, de sorte qu'elles se font assez lentement lorsque l'on ajoute séparément chaque constituant à l'eau. (Les différentes formes de gonflement s'obtiennent, par contre, presque spontanément dans l'eau lorsque l'on prend soin de mélanger très intimement au préalable les deux constituants, par exemple par dissolution dans un solvant organique et évaporation.) Si donc l'anion ou le cation actif sont déjà associés ioniquement (ainsi que nous le verrons plus bas) avec les constituants de la bactérie, les phospholipides que l'on ajoute ont très peu de chance de pouvoir les déplacer, d'autant plus qu'ils sont peu solubles (surtout la lécithine) et ioniquement moins réactifs. Inversement, leur fixation sur la bactérie doit être, pour les mêmes raisons, plus labile. Les mêmes auteurs ont observé une action antagoniste avec un composé à chaîne longue non-ionique du type ester de polyglycérol. Ce fait vient à l'appui de l'explication donnée plus haut sur le mode d'association surtout par intervention des parties hydrocarbonées et est à rapprocher du cas de l'association avec le cholestérol.

Plus récemment Polonovski et Machebeuf [44] ont montré que l'action hémolytique de deux cations actifs (ammoniums quaternaires) est inhibée par l'addition préalable de cholestérol et, à un degré moindre, par l'addition de lécithine. Ainsi que l'admettent ces auteurs, ici également, il faut faire intervenir la formation

d'associations moléculaires entre cation actif et « inhibiteur ». Remarquons aussi que les associations avec la lécithine sont beaucoup plus hydrophiles et, par suite, plus labiles [4], ce qui expliquerait l'effet antagoniste atténué de la lécithine.

Mais les substances actives peuvent aussi interagir ioniquement. On sait qu'un anion actif en solution est précipité par addition d'un cation actif et réciproquement. Une méthode de dosage est même basée sur cette précipitation par neutralisation. Dans un milieu de culture, l'addition d'un anion actif « inhibera » donc l'action bactéricide ou hémolysante d'un cation actif et vice-versa. (En réalité, il y a simplement élimination, comme dans le cas de CaCl_2 avec les acides gras.) C'est bien ce que constatent Polonovski et Machebœuf en ce qui concerne l'hémolyse. L'addition d'oléate de sodium ou de cholate de sodium à une solution de zéphirool (cation actif) produit un retard maximum (100 minutes) à l'hémolyse, lorsque l'anion et le cation actifs sont en quantités équimoléculaires.

Un fait beaucoup plus intéressant a été décrit par Valko et Du Bois [14], dans le cas de l'action bactéricide. Le micro-organisme qui a subi l'action d'un cation actif et qui a perdu le pouvoir de se reproduire peut être ramené à la vie par addition subséquente d'une *dose équivalente* d'anion actif, pourvu que le contact avec le cation actif n'ait pas duré plus d'une dizaine de minutes. Autrement dit, le cation est éliminé avant même que des transformations trop profondes ne se soient effectuées. Certains pourraient dire qu'il y a eu désorption, mais un simple lavage ne ramène pas les microbes à la vie : le cation est lié ioniquement à la substance de la bactérie. Le phénomène est à rapprocher plutôt d'une double décomposition. Valko et Du Bois n'hésitent pas à ramener l'action antagoniste différée à un phénomène d'échange d'ions et à dégager l'analogie avec le comportement antibactérien des ions métalliques et des colorants basiques.

Qui dit double décomposition, envisage un premier composé. Quels sont les corps avec lesquels les agents actifs peuvent se combiner ioniquement dans la cellule ? Nous reviendrons plus loin sur l'interprétation de ces phénomènes après avoir examiné et comparé des faits d'expérience.

III. — INTERACTIONS ENTRE LES DÉTERSIFS ET LES PROTÉINES ET MODES D'ACTION SUR LES MICRO-ORGANISMES.

On sait que les anions actifs précipitent les protéines en s'y combinant lorsque la réaction du milieu est acide. On sait aussi que les cations actifs agissent de même sur les protéines lorsque le milieu est basique. Il faut, en effet, que la protéine, qui renferme des ions acides et des ions basiques, se comporte, dans le premier

cas comme une base et, dans le deuxième cas, comme un acide. On a pu montrer cependant qu'il y a interaction, sans précipitation, dans d'autres régions de pH.

Ces mêmes conditions d'interaction se retrouvent avec les colorants acides et basiques. La présence de plusieurs groupes ioniques sur le détersif ou le colorant n'est pas favorable à l'association avec une protéine. Par contre, il y a accroissement de la force d'interaction d'une façon presque discontinue lorsque la longueur de la chaîne hydrocarbonée passe de 8 à 10 atomes de carbones. Les raisons théoriques de cet accroissement de l'interaction à partir d'une certaine longueur de la chaîne hydrocarbonée n'ont pas à être discutées ici. (Pour la bibliographie et les détails sur les modalités d'interaction entre anions ou cations actifs et protéines, voir [15]). Quoi qu'il en soit, le phénomène est surtout d'origine ionique, ainsi que le montre l'influence prépondérante du pH, et il n'y a pas d'interaction lorsque les molécules ne sont pas ioniques (esters des acides gras, glycérides, cholestérol). La nature de la protéine joue un grand rôle. C'est ainsi que les globulines réagissent moins avec les détersifs et les colorants que ne le fait l'albumine du sérum. Il y a donc action spécifique en ce qui concerne la protéine.

Remarquons enfin que l'interaction protéine-détersif ou colorant, donnant souvent lieu à un composé insoluble, est gouvernée par un rapport stoechiométrique des deux constituants et ne dépend pas, dans d'assez larges limites, de la concentration. De sorte qu'une dilution subséquente ne saurait détacher facilement le détersif de la protéine. D'ailleurs, la fixation tenace d'anions ou de cations par les protéines s'observe même avec de petits ions. On sait que les métaux lourds sont fixés par les protéines même lorsqu'ils se trouvent à l'état de traces dans l'eau. Joly et Barbu [16] ont constaté récemment que l'albumine retenait les ions SO_4^{--} même après plusieurs semaines de dialyse renouvelée. Mais il suffit d'ajouter un sel de baryum à la solution pour voir précipiter de fins cristaux de SO_4Ba .

Ceci dit, nous devons nous attendre à ce que l'addition d'une protéine, et plus particulièrement de la sérum-albumine (puisque elle est plus réactive) à un milieu inhibe l'action des détersifs en se combinant à ceux-ci et les immobilisant ainsi. A la suite des faits constatés par Dubos [17], M. R. Pollock [18] a pu démontrer d'une façon indiscutable que l'albumine du sérum ajouté dans un milieu de culture fixait les traces d'acide gras (tel que l'acide oléique) qui, sans l'addition de sérum, inhibe la croissance de certaines bactéries (1). Il a pu montrer également que les globulines

(1) Nous n'envisageons ici que les actions bactériostatiques et non pas les actions favorisantes qui se manifestent pour les doses excessivement faibles en acides gras [17, 18, 19].

ne présentaient pas cette propriété. Le même antagonisme a été étudié par McNally [20] en ce qui concerne l'action antibactérienne des mono-esters de l'acide succinique substitué (anions actifs) sur *Myco. tuberculosis*. Des constituants du sérum, seule l'albumine inhibe l'action antibactérienne de l'anion actif.

Il est bien connu que le sérum exerce une action « protectrice » contre les agents hémolytiques et qu'il est nécessaire de laver les globules rouges avant d'en étudier l'hémolyse. L'albumine du sérum, à l'exclusion des globulines, inhibe la forte action hémolytique de ces mêmes dérivés de l'acide succinique mono-estérifiés. C'est ainsi que l'addition du sérum humain normal dans la proportion de 1/10, nécessite l'intervention de quantités environ cent fois plus grande de l'anion actif, qu'il n'en faut en l'absence de protéine pour produire l'hémolyse. Il y a d'ailleurs proportionnalité entre la quantité d'albumine et la quantité d'agent hémolytique ; ce qui est en faveur de la thèse de la formation d'une association stoechiométrique.

Dans le travail déjà cité plus haut, Polonovski et Machebœuf [41] signalent l'action antagoniste de la sérum-albumine vis-à-vis des cations actifs (ammoniums quaternaires). Mais, dans les conditions de leurs expériences, il leur a fallu employer des doses relativement élevées d'albumine. Ceci s'explique du fait que ces auteurs opéraient à la neutralité et qu'ainsi qu'ils l'ont montré eux-mêmes [21] avec les mêmes cations actifs, les interactions avec les protéines n'atteignent leur intensité maxima qu'à des pH supérieurs à 8. Le sérum et, encore mieux, les cénapses lipoprotéiques se sont montrés plus fortement antagonistes. En effet, ils renferment, en plus de la protéine, des phospholipides et du cholestérol, dont nous avons vu plus haut les actions antagonistes propres. Une partie du détersif peut se substituer aux lipides dans leur association avec les protéines, l'autre s'associer aux lipides et au cholestérol ainsi déplacés.

L'action bactériostatique des amines à chaîne longue est inhibée par le sérum, mais non celle des dérivés de l'acridine. D'après Albert, Rubbo et Burvill [22], ces dérivés, de même que d'autres bases hétérocycliques à molécules planes, auraient des particularités stériques qui font qu'elles se combinent moins facilement avec les protéines du sérum, mais qui ne les empêchent pas de se combiner avec les « récepteurs vitaux » sur les bactéries. Quelle qu'en soit l'explication, nous rencontrons ici un exemple qui illustre la spécificité dans l'interaction avec les protéines. Nous devons nous attendre à ce que parmi les protéines constitutives du micro-organisme, comme parmi les protéines du sérum sanguin, certaines puissent se combiner ou ne pas se combiner avec l'anion ou le cation actif.

Si les actions hémolytiques et antibactériennes des anions et

cations actifs sont dues, suivant les cas, soit à la possibilité d'association avec les lipides ou stériles, soit à une interaction avec certaines des protéines ou des autres substances du micro-organisme possédant comme les protéines des ions acides ou basiques faibles (acides nucléiques, etc.), on doit s'attendre à retrouver dans les modalités de ces actions les particularités relevées dans l'interaction entre ces mêmes agents et les protéines (2).

Dans des expériences aujourd'hui classiques, Engelhardt [23] avait démontré la réversibilité de l'action bactéricide de $HgCl_2$ sur *Staphylococcus aureus*. McCalla [24] a répété les mêmes expériences avec *E. coli*. Les micro-organismes mis en contact avec le sel de mercure ne sont pas régénérés par un simple lavage. Mais il suffit de traiter leur suspension par H_2S pour précipiter le mercure et permettre aux microbes de se reproduire. Ainsi la fixation des ions métalliques par les microbes rappelle celle des mêmes ions par les protéines. La régénération par précipitation du mercure rappelle tout aussi bien la régénération par traitement par un anion actif de bactéries ayant d'abord subi l'action d'un cation actif [14].

L'optimum de pH observé dans l'interaction avec les protéines se retrouve dans l'action antibactérienne. Dans les milieux de culture microbienne, l'action des cations actifs est d'autant plus marquée que la réaction est plus basique et, inversement, c'est lorsque la réaction du milieu est acide que les anions actifs agissent le plus. Déjà avec des acides faibles à petites molécules, tels que les acides acétique, propionique, butyrique, monochloracétique, oxalique, les acides sélénieux ou nitreux, Huntington et Rahn [25] ont montré que l'activité antiseptique croît très rapidement avec l'acidité du milieu. L'activité bactériostatique et bactéricide des colorants basiques croît avec le pH [26, 27], ce qui avait conduit Stearn et Stearn [28] à admettre que le colorant se combine chimiquement avec certaines protéines dans la cellule. L'activité antibactérienne des bases de la série de l'acridine croît aussi avec le pH. Albert, Rubbo et leurs collaborateurs [29] ont voulu relier l'activité des différents dérivés de l'acridine à leur degré d'ionisation, un composé étant d'autant plus actif qu'il est plus ionisé au pH où se fait l'expérience. Or ceci semble en contradiction avec la constatation faite par les mêmes auteurs que l'activité de leurs bases hétérocycliques augmente avec le pH, c'est-à-dire

(2) Les deux types d'association (avec les lipides et stériles ou avec les protéines) pourraient d'ailleurs ne pas être exclusifs l'un de l'autre si l'on admettait la structure que j'ai proposée pour les lipo-protéines naturelles [15]. Il y aurait peut-être simultanément, d'une part, association, avec ou sans substitution, dans les micelles lipido-stériliques et, d'autre part, interaction ionique de l'ensemble avec les protéines.

avec la diminution de son ionisation. Mais cette contradiction peut être dissipée en ne prenant en considération que le pK des différentes bases et non pas, comme le font les auteurs, l'ionisation à un pH donné. L'ionisation varie avec le pH et c'est bien dans les domaines de faible ionisation que l'activité est la plus grande. Mais la réactivité (c'est-à-dire la force de liaison) est d'autant plus grande que la base est plus forte, c'est-à-dire que le pK est plus grand.

Etudiant l'action de toute une série de détergents anioniques et cationiques sur le métabolisme de différentes bactéries, Baker, Harrison et Miller [30] ont pu montrer que les détergents cationiques ont une action inhibitrice maximum pour des pH alcalins, alors qu'inversement les détersifs anioniques ont une action inhibitrice maximum pour des pH acides du milieu. Ces mêmes auteurs, en comparant l'action des différents termes de la série des alcoyl-sulfates, ont constaté un accroissement brusque de l'activité lorsque l'on passe du terme à 10 au terme à 12 atomes de carbone dans la chaîne. Avec les mono-esters des dérivés substitués de l'acide succinique étudiés par McNally [20], les activités bactéricides et hémolytiques deviennent importantes à partir du terme dont la chaîne substituée à 8 ou 10 atomes de carbone et passent par un maximum avec la chaîne à 14 atomes de carbone. Ainsi qu'on l'a vu, Baranger avait trouvé que l'activité hémolytique des esters de la choline se manifestait à partir du terme à 10 atomes de carbone.

Ainsi, dans l'action antibactérienne, comme dans l'activité hémolytique, on retrouve l'influence de la longueur des chaînes hydrocarbonées signalée à propos de l'association avec les lipides et le cholestérol et à propos de l'interaction avec les protéines. Enfin la variation de la quantité d'acide laurique fixée en fonction du pH lors de l'hémolyse [5] montre bien qu'il s'agit d'une véritable neutralisation ionique dans le globule rouge. En effet, il faut beaucoup plus d'anions actifs à pH acide qu'à pH alcalin, ce qui correspond bien à un plus grand nombre de groupes basiques ionisés à satisfaire en milieu acide, ces groupes faisant partie des protéines ou, d'une façon plus générale, de l'ensemble des complexes du globule rouge. L'estérification des acides gras leur enlève d'ailleurs leur pouvoir hémolytique, de même qu'elle supprime leur activité bactériostatique (17, 31).

IV. — REMARQUES ET INTERPRÉTATIONS.

Si les interactions des cations et des anions actifs, comme celles des colorants, avec les protéines sont sous la dépendance de facteurs spécifiques, l'ensemble des conditions physico-chimiques apparaissent avec un caractère de généralité. Il en est de

même des actions sur les micro-organismes. En effet, le mécanisme de l'hémolyse est, selon toute vraisemblance, différent de l'action antibactérienne. Bien plus, non seulement le mécanisme de l'action bactériostatique peut être différent de l'action bactéricide, ainsi que l'ont montré Hoffmann et Rahn [27] en ce qui concerne le violet cristal agissant sur *S. lactis*, mais encore chacun de ces mécanismes peut varier suivant l'agent et le micro-organisme utilisés. Néanmoins, il se dégage de l'analyse de l'ensemble des résultats que lorsqu'il y a action, qu'il s'agisse d'hémolyse, d'action bactériostatique ou bactéricide, de détersifs, de colorant ou même de petits ions, les modalités et les conditions générales sont les mêmes. A savoir : tous les caractères d'une neutralisation ionique ou d'un échange d'ions, optimum de pH suivant qu'il s'agit d'un anion ou d'un cation, optimum de longueur de chaîne, inhibition par le cholestérol, les phospholipides, la sérum-albumine.

Comment peut-on interpréter cette généralité de l'aspect physico-chimique ? Nous avons vu dès le début ce qu'il faut penser d'une adsorption possible à la surface du micro-organisme. Ainsi que l'admettent Valko et Du Bois [14], à la suite de l'idée introduite par McCalla [24] pour les petits cations, l'action antibactérienne de tous les cations actifs peut être ramenée à une question d'échange de cations par la bactérie. « Les cations superficiellement actifs, disent Valko et Du Bois, pénètrent probablement dans les bactéries comme le font les colorants basiques et il est faux de considérer leur adsorption en tant qu'un phénomène de surface. » (Remarquons qu'il serait préférable de parler d'absorption plutôt que d'adsorption). Le comportement symétrique des anions actifs en ce qui concerne leur interaction avec les protéines et les lipides ou stériles nous amène à penser que le mécanisme de leur action sur les micro-organismes est semblable à celui des cations. Leur action nettement moins intense serait peut être en relation avec le fait que la plupart des microbes ont une charge résultante négative, comme si dans les conditions normales l'ensemble de leurs propres anions l'emportait sur l'ensemble de leurs propres cations. On pourrait dire qu'ainsi la réactivité ionique des micro-organismes serait faible par rapport à un anion actif, et, au contraire, forte par rapport à un cation actif.

Dyar et Ordal [32] ont étudié la mobilité électrocinétique de différents microbes en présence de quantités croissantes d'un cation actif. Ils ont constaté que la charge de la bactérie, d'abord négative, diminue à partir d'une certaine concentration, puis s'annule et devient positive à des concentrations supérieures. Or, les bactéries meurent à partir du moment où leur charge négative commence à diminuer. On ne peut, comme l'ont fait ces auteurs,

déduire de ces expériences des conclusions sur l'état de la surface des bactéries et penser par exemple que le cation s'est adsorbé à la surface.

Si la plupart des micro-organismes sont chargés négativement, cela signifie que, dans le domaine du pH où on les étudie, la charge de leurs protéines ou, d'une façon plus générale, la résultante des charges de tous les électrolytes colloïdaux et autres dont ils sont constitués est négative. Dans ces conditions, l'addition (dans la masse du microorganisme) d'un électrolyte colloïdal cationique tendra à neutraliser sa charge et même à la faire changer de signe. En même temps, l'introduction de ce cation actif ne peut manquer de perturber l'équilibre général du système et entraîner la mort. A l'appui de cette interprétation, on peut invoquer le comportement d'une gouttelette de coacervat dans un champ électrique. En étudiant la migration dans un champ électrique de gouttelettes de coacervat formé par des mélanges de gélatine et de gomme arabique, Bungenberg de Jong et Dekker [33] ont montré que la charge de la gouttelette variait suivant les proportions des deux constituants et s'annulait pour une certaine composition. Il y a une véritable neutralisation entre la gélatine et la gomme arabique chargées de signes contraires et la charge apparente dépend de l'excès de l'une ou de l'autre. Or il n'existe pas de membrane à la surface de ces gouttelettes. On pourrait dire d'ailleurs que la charge superficielle est la même que la charge à l'intérieur de chaque gouttelette ou de chaque bactérie.

Tout en admettant implicitement que le lieu de l'action de l'agent actif est, en définitive, à l'intérieur du microbe, certains auteurs toujours préoccupés par les phénomènes de surface, font intervenir la facilité plus ou moins grande de pouvoir traverser la membrane. Constatant que l'activité antiseptique de certains acides faibles est accrue en milieu acide et que, précisément en milieu acide, l'ionisation de ces corps est évidemment plus faible, Huntington et Rahn [25] ont conclu que seule la fraction non dissociée des molécules était active. Cela s'expliquerait par le fait qu'il est difficile pour des ions de traverser la membrane d'une cellule vivante [34]. Mais c'est là ne tenir compte que du seul agent actif en ignorant les changements dans la réactivité que subissent les substances amphotères, comme les protéines, lorsque le pH du milieu change. D'ailleurs, l'exemple de l'interaction entre anions et cations actifs et protéines est là pour nous montrer la similitude du phénomène, alors qu'il ne saurait, dans ce cas évident, être question de membrane.

Nous avons vu que toutes les protéines ne fixent pas de la même façon les anions et les cations actifs. Il n'y a donc *a priori* aucune raison pour que tous les micro-organismes réagissent de la même

façon vis-à-vis de tous les agents, puisque tous les micro-organismes ne contiennent pas les mêmes protéines. De plus, nous avons vu qu'il y avait des effets antagonistes et que si une place est occupée par une certaine molécule ionique, une autre ne peut pas s'y substituer; la composition du micro-organisme en phospholipides et autres composés ioniques interviendra donc aussi. Enfin, d'une façon générale, interviendra la charge globale de l'ensemble du système.

Il suffit de parcourir par exemple les tableaux du travail de Baker, Harrison et Miller [30] pour constater les variations dans l'action bactériostatique et dans l'action sur le métabolisme avec la substance utilisée et avec le microorganisme. Mais on peut conclure avec les auteurs, que, d'une façon générale, les anions actifs n'inhibent le métabolisme que des micro-organismes Gram-positifs, et encore à un degré moindre que les cations actifs.

Dans le cas particulier de l'action de l'acide laurique, il ressort des recherches de Eggerth [35] que cette substance n'est bactéricide pour les microbes Gram-positifs, qu'au-dessous de pH 7,3 environ. Inversement, elle n'est bactéricide pour les bactéries Gram-négatives qu'au-dessus de pH 7,5 et à de très fortes doses. Nous avons montré [36] que s'il n'y avait pas action bactéricide pour des micro-organismes Gram-positifs au-dessous de pH 7,5, il y avait néanmoins inhibition de la croissance. La position à pH 7,5 de la frontière qui limite deux domaines d'action différente est en relation avec un changement net dans l'ionisation de l'acide laurique à ce pH particulier.

De tout ce qui précède, on pourrait conclure que les micro-organismes Gram-positifs et Gram-négatifs ont des réactivités ioniques différentes. On ne peut manquer de remarquer qu'après tout, la distinction même en positif et négatif par la coloration de Gram n'est basée, elle aussi, que sur la fixation ou la non fixation d'un colorant ionique par les constituants du micro-organisme. Il est étonnant de constater que, malgré le traitement brutal de la préparation, ces constituants puissent encore se différencier par leur caractère ionique et peut-être lipodique.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] BUNGENBERG DE JONG (H. G.) et DE RUITTER (L.). *Proceed. Ned. Akad. Wetensch.* Amsterdam, 1947, **50**, 836.
- [2] DERVICHIAN (D. G.) et LACHAMPT (F.). *Bull. Soc. Chim. de France*, 1946, **13**, 486, 491 et 495.
- [3] BROWAERTS (J.) et DERVICHIAN (D. G.). *C. R. Soc. Biol.*, 1946, **140**, 136.
- [4] DERVICHIAN (D. G.) et JOLY (M.). *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1946, **28**, 426. — DERVICHIAN (D. G.) et MAGNANT (C.). *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1946, **28**, 419. — DERVICHIAN (D. G.) et MAGNANT (C.). *C. R.*

- Soc. Biol.*, 1946, **140**, 94. — DERVICHIAN (D. G.). *Trans. Farad. Soc.*, 1946, **42 B**, 180.
- [5] DERVICHIAN (D. G.). *Ces Annales*, 1949, **77**, 193.
- [6] KODICEK (E.). *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1948, **30**, 946.
- [7] DELEZENNE (C.) et FOURNEAU (E.). *Bull. Soc. Chim.*, 1914, **15**, 421.
- [8] BARANGER (P.). *Ann. Physiol.*, 1937, **13**, 341.
- [9] MACHEBOEUF (M.) et TAYEAU (F.). *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1941, **23**, 49. — TAYEAU (F.). *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1944, **26**, 287. — MACHEBOEUF (M.) et REBEYROTTE (P.). *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1944, **26**, 475.
- [10] DERVICHIAN (D. G.) et MAGNANT (C.). *Ces Annales*, 1947, **73**, 841.
- [11] POLONOVSKI (I.) et MACHEBOEUF (M.). *Ces Annales*, 1947, **73**, 980.
- [12] BAKER (Z.), HARRISON (R. W.) et MILLER (B. F.). *J. exp. Med.*, 1941, **74**, 621.
- [13] DERVICHIAN (D. G.). *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1946, **28**, 433.
- [14] VALKO (E. I.) et DU BOIS (A. S.). *J. Bact.*, 1944, **47**, 15.
- [15] DERVICHIAN (D. G.). Discussion on Lipo-Proteins. *Trans. Farad. Soc.* (sous presse).
- [16] JOLY (M.) et BARBU (E.). Communication privée.
- [17] DUBOS (R. J.) et DAVIS (B. D.). *J. exp. Med.*, 1946, **83**, 409. — DUBOS (R. J.). *J. exp. Med.*, 1947, **85**, 9.
- [18] POLLOCK (M. R.). *Brit. J. exp. Path.*, 1947, **28**, 295.
- [19] WILLIAMS (W. L.), BROQUIST (H. P.) et SNELL (E. E.). *J. Biol. Chem.*, 1947, **170**, 619.
- [20] McNALLY (P. A.). *Brit. J. exp. Path.*, 1947, **28**, 161.
- [21] POLONOVSKI (I.) et MACHEBOEUF (M.). *Ces Annales*, 1948, **74**, 196.
- [22] ALBERT (A.), RUBBO (S. D.) et BURVILL (M. I.). *Brit. J. exp. Path.*, 1949, **30**, 159.
- [23] ENGELHARDT (H.). *Disinfection*, 1922, **7**, 63.
- [24] McCALLA (T. M.). *J. Bact.*, 1940, **40**, 23.
- [25] HUNTINGTON (G. I.) et RAHN (O.). *J. Bact.*, 1945, **50**, 655.
- [26] STEARN (A. E.) et STEARN (E. W.). *J. Bact.*, 1926, **11**, 345.
- [27] HOFFMANN (C. E.) et RAHN (O.). *J. Bact.*, 1944, **47**, 177.
- [28] STEARN (A. E.) et STEARN (E. W.). *J. Bact.*, 1924, **9**, 491.
- [29] ALBERT (A.), RUBBO (S. D.), GOLDACRE (R. G.), DAVEY (M. E.) et STONE (J. D.). *Brit. J. exp. Path.*, 1945, **26**, 160.
- [30] BAKER (Z.), HARRISON (R. W.) et MILLER (B. F.). *J. exp. Med.*, 1941, **73**, 249 et **74**, 611.
- [31] SOLOMIDÈS (I.). *Ces Annales*, 1948, **74**, 328.
- [32] DYAR (M. T.) et ORDAL (E. I.). *J. Bact.*, 1946, **51**, 148.
- [33] BUNGENBERG DE JONG et DEKKER (W. A. L.). *Kol. Beih.*, 1935, **43**, 143.
- [34] RAHN (O.) et CONN (J. E.). *Ind. Eng. Chem.*, 1944, **36**, 185.
- [35] EGGERTH (A. H.). *J. gen. Physiol.*, 1926, **10**, 147.
- [36] DERVICHIAN (D. G.) et MOUSSET (H.). *Ces Annales*, 1949, **77**, 703.

**CROISSANCE ET RESPIRATION
D'UNE SOUCHE STREPTOMYCINO-EXIGEANTE
DE *BACILLUS CEREUS* PRIVÉE
DE L'ANTIBIOTIQUE-FACTEUR DE CROISSANCE**

par PIERRE SCHAEFFER.

(Institut Pasteur, Service de Physiologie microbienne.)

INTRODUCTION.

Depuis les travaux de Miller et Bohnhoff [6], on sait que les mutants bactériens capables de supporter des concentrations élevées en streptomycine (Sm) sont de deux sortes : les mutants *Sm-résistants* dont la croissance a lieu, que la Sm soit ou non présente dans le milieu, et les mutants *Sm-exigeants* qui ne peuvent être cultivés qu'en présence de l'antibiotique. Ces derniers seuls nous occupent ici ; leur existence a été signalée chez de nombreuses espèces bactériennes comprenant des organismes Gram-positifs, Gram-négatifs et acido-résistants (Kushnick et coll. [4], Paine et Finland [7], Yegian et Budd [12], Lenert et Hobby [5]).

Qu'une substance connue pour ses propriétés antibactériennes puisse, vis-à-vis de certains mutants bactériens, se comporter comme un facteur de croissance, a dès l'abord frappé les esprits ; une telle situation fut signalée pour la première fois et analysée par Emerson [1] chez des souches sulfamido-exigeantes de *Neurospora* (voir plus loin, Discussion). Mais sur la nature du phénomène d'exigence vis-à-vis de la Sm, nous n'avons trouvé aucune donnée. Nous avons isolé une souche Sm-exigeante de *Bacillus cereus* pour en entreprendre l'étude physiologique. Nous rapportons ici nos premiers résultats qui ont déjà fait l'objet de deux notes préliminaires (Schaeffer [10]).

PARTIE EXPÉRIMENTALE.

OBTENTION D'UN MUTANT SM-EXIGEANT. — Une souche de collection, étiquetée « Caron », de *Bacillus subtilis* fut choisie comme souche de départ. Son étalement sur milieu nutritif gélosé, à fin de réisolement, fit apparaître deux sortes de colonies que nous avons dénommées Smooth et Rough sur la seule foi de leur

aspect. La forme Smooth fut choisie comme moins agglutinable spontanément en milieu liquide. Dans la suite, différentes anomalies de comportement nous conduisirent à vérifier l'identité de notre souche de départ (1); l'application de la clé de Bergey révéla qu'il s'agissait de *Bacillus cereus*. Cette rectification doit s'appliquer à nos notes précédentes [10].

Croyant initialement travailler sur un *Bacillus subtilis*, nous nous attendions, conformément aux observations de Kushnick [4], à ce que les mutants Sm-exigeants désirés fussent anaérobies stricts; c'est pourquoi la recherche des mutants fut faite en tubes de gélose profonde, selon la technique de culture habituellement appliquée aux germes anaérobies; 0,2 cm³ d'une culture de seize heures en bouillon de notre souche (soit environ 10⁸ germes viables) furent ensemencés dans des séries de tubes de gélose nutritive glucosée dont la concentration en Sm variait de 0 à 1.000 µg. par centimètre cube (2). Après trois jours de séjour à 37°, chaque colonie apparue était repiquée dans deux tubes de gélose profonde dont l'un seulement contenait de la Sm, à la concentration du tube d'où provenait la colonie étudiée. Ces tests d'exigence furent cessés à la première colonie exigeante obtenue, sans que l'on ait cherché à déterminer la fréquence de la mutation. La colonie exigeante fut obtenue dans un tube à 600 µg. de Sm par centimètre cube.

CARACTÈRES PRINCIPAUX DE LA SOUCHE S.SmE DE « *BACILLUS CEREUS* ». — 1° *Aérobiose facultative*. — Les repiquages en gélose profonde contenant de la Sm en concentration variable suffirent déjà à montrer que : 1° la souche Sm-exigeante obtenue (dite S.SmE) est aérobie facultative; 2° la présence de Sm est indispensable à la croissance *tant anaérobie qu'aérobie*; 3° à concentration égale en Sm, la croissance aérobie est la plus rapide, mais, tant en aéro- qu'en anaérobiose, la vitesse de croissance dépend de la concentration en Sm (voir fig. 1 bis et 2). La plupart de ces propriétés seront étudiées plus loin au moyen de courbes de croissance.

2° *Stabilité et entretien*. — La souche fut entretenue en aéro-biose par repiquages bihebdomadaires en bouillon à 200 µg. de Sm par centimètre cube, sans que jamais fût observée une croissance normale dans les tubes-témoins dépourvus de Sm. La stabilité de la souche est telle qu'il est aisé d'en faire l'étude phy-

(1) Cette identification fut effectuée par B. C. J. G. Knight, du Welcome Physiological Laboratory, Londres, que nous remercions vivement.

(2) Différentes marques et préparations de Sm ont été utilisées au cours de ce travail; toutes les concentrations données s'entendent en streptomycine-base pure.

siologique. La faculté de sporulation étant conservée chez la souche S.SmE, sa conservation s'effectue au mieux au moyen de spores sèches.

3° Les colonies de la souche S.SmE, étalée sur milieu gélosé, sont uniformément d'aspect Smooth. Les bactéries ont les caractères morphologiques et tinctoriaux d'un *Bacillus cereus* ordinaire, à la condition toutefois que leur croissance ait eu lieu en présence de Sm en concentration suffisante (supérieure à 30 µg. par centimètre cube). Lorsque cette concentration est par trop basse (10-20 µg. par centimètre cube), les bactéries se présentent comme de longs filaments qui sont encore Gram-positifs. Ces filaments résultent à la fois d'une tendance accrue à former des chaînes d'éléments bactériens et d'une taille anormalement grande de chacun de ces éléments.

TECHNIQUE DES EXPÉRIENCES PORTANT SUR LA CROISSANCE.

a) MILIEU DE CULTURE — Plusieurs acides aminés sont généralement nécessaires à la croissance de *Bacillus cereus* ; ainsi en est-il, en particulier, de la souche « Caron » et du mutant SmE qui en dérive. Un milieu peu coloré étant, par ailleurs, souhaitable pour effectuer des mesures photométriques, nous avons utilisé un milieu salin (3) additionné, après autoclavage, de glucose (concentration finale 2 p. 1.000) et de peptone [protéose-peptone Difco, concentration finale 1 p. 1.000] (4). La Sm était alors ajoutée à volonté, sous forme de solutions aqueuses stériles concentrées.

b) OBTENTION DES CULTURES. — Les cultures furent faites à 34° en présence de 200 µg. de Sm par centimètre cube, les tubes étant inclinés et agités pendant l'incubation. En ensemençant la veille de l'expérience plusieurs tubes de milieu avec des inoculats de taille variable, on pouvait choisir, au matin du jour suivant, la culture qui, bien que riche, n'avait pas encore atteint son développement maximum. Ainsi était-on assuré de ne travailler que sur des bactéries en phase exponentielle de croissance, prêtes à reprendre leur multiplication sans présenter de phase de latence.

c) ÉTABLISSEMENT DES COURBES DE CROISSANCE. — La culture exponentielle choisie avait une densité optique (d.o.) de 250 à

(3) PO_4KH_2 , 20 g. ; N/1 NaOH, 70 cm³ ; ClNH_4 , 2 g. ; $\text{SO}_4\text{Mg} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,2 g. ; Cl_2Ca , 0,01 g. ; $\text{SO}_4\text{Fe} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,0005 g. ; eau bidistillée, pour 1.000 cm³ ; pH = 6,8.

(4) Nous appellerons milieu de base le milieu salin glucosé et peptoné mais dépourvu de Sm.

350 unités (5). La d.o. initiale convenable pour établir une courbe de croissance (voisine de 5 unités) pouvait donc s'obtenir par une dilution de 50 à 70 fois de la culture par du milieu de base stérile. Une telle dilution amenait 4 $\mu\text{g.}$ par centimètre cube au maximum la concentration résiduelle en Sm, à supposer qu'il n'y ait pas eu consommation d'antibiotique pendant la croissance. C'est dire qu'il est possible d'établir une carence très efficace en antibiotique par simple dilution de la culture. Comme la centrifugation des bactéries, suivie de remise en suspension dans du milieu de base, entraîne ensuite une phase de latence assez longue, nous avons toujours établi la carence en antibiotique par dilution. La culture diluée, carencée en Sm, était alors répartie dans des tubes de verre à section carrée et à faces parallèles, identiques entre eux et conçus pour permettre des mesures électrophotométriques directes. Chaque tube, stérile, recevait 4,9 cm^3 de culture diluée et 0,1 cm^3 d'eau ou d'une solution aqueuse de Sm du titre désiré. Après mesure de la d.o. initiale des cultures carencées, les tubes inclinés étaient agités à 34°. La croissance était suivie par des mesures périodiques de d.o., aussi longtemps que le permettait l'échelle de l'appareil de mesure.

TECHNIQUE DES EXPÉRIENCES PORTANT SUR LA RESPIRATION.

Ces expériences furent faites à 34° dans des fioles de Warburg sur 3 cm^3 de suspension bactérienne et en présence de KOH. Pour avoir une absorption d'oxygène mesurable avec précision, il fallait que la suspension utilisée ait une d.o. voisine de 100. C'est dire que la dilution d'une culture de d.o. 250-300, en croissance dans un milieu à 200 $\mu\text{g.}$ de Sm par centimètre cube, ne suffisait plus à amener à une valeur négligeable la concentration résiduelle en antibiotique. La centrifugation des cultures étant proscrite en raison de la lag-phase qu'elle entraîne, on conserva l'établissement de la carence par dilution, mais en abaissant la concentration en Sm du milieu où se faisait la croissance des bactéries destinées aux expériences. Encore fallait-il ne pas abaisser cette concentration au point d'obtenir des formes anormales filamenteuses. Les bactéries furent donc cultivées en présence de 30 $\mu\text{g.}$ de Sm par centimètre cube, l'aspect normal des cultures étant contrôlé avant leur utilisation. Ces cultures, diluées 10 fois, avaient une concentration résiduelle en Sm égale ou inférieure à 3 $\mu\text{g.}$ par centimètre cube. Pour pouvoir suivre *simultanément* les valeurs prises par la d.o. et par la consommation d'oxygène des cultures en fioles

(5) Les mesures de d.o. ont été faites à l'électrophotomètre de Meunier en lumière bleue, avec une cuve de 1 cm. Dans ces conditions, 1 unité de d.o. correspond à 1 $\mu\text{g.}$ environ de bactéries sèches par centimètre cube de culture.

de Warburg, les expériences étaient conduites de la façon suivante : 10 fioles identiques, ne contenant (à part la potasse) que la suspension dans le milieu de base des bactéries carencées, étaient soumises à des mesures manométriques toutes les trente minutes. Après chaque mesure, une fiole était prélevée et la d.o. de la culture qu'elle contenait était immédiatement mesurée. L'expérience durait quatre heures et demie ; une fiole témoin, dont on ne mesurait la d.o. qu'avant et après l'expérience, recevait au temps zéro, à partir du diverticule, de la Sm pour une concentration finale de 100 μ g. par centimètre cube.

RÉSULTATS.

I. ETUDE DE LA CROISSANCE. — Les courbes de croissance aérobie obtenues au cours d'une même expérience sont représentées en coordonnées normales (fig. 1) et en coordonnées semi-logarithmiques (fig. 1 bis). On voit (fig. 1, courbe 0) qu'il subsiste, chez les bactéries carencées en Sm, une certaine croissance qui, en coordonnées normales, est *linéaire* pendant environ cinq heures. Puis la d.o. se stabilise à une valeur qui est 10 fois celle de la d.o. initiale. La *croissance résiduelle* dont sont capables les bactéries Sm-exigeantes carencées en Sm représente donc l'équivalent de plus de 3 divisions. La première division se fait en trente-six minutes (6), la deuxième en soixante, la troisième en cent quarante : la vitesse de la croissance résiduelle des bactéries carencées est constamment décroissante. La pente de la droite de croissance (fig. 1, courbe 0) varie d'ailleurs d'une expérience à l'autre, même lorsqu'on maintient aussi identiques que possible les conditions expérimentales. L'addition sur la figure 1 de la courbe 0 bis, obtenue dans une expérience différente, permet de s'en rendre compte.

En présence de faibles concentrations en Sm, on peut encore observer une croissance linéaire (fig. 1, courbe 10), mais la pente de la droite de croissance est alors plus grande et, surtout, la d.o. ne montre pas (ou ne montrerait que plus tardivement) de tendance à la stabilisation.

Pour les concentrations en Sm allant de 20 à 800 μ g. par centimètre cube, les courbes de la figure 1 bis montrent, plus ou moins précocement, des portions linéaires caractéristiques de croissances exponentielles à taux constant. Ce taux varie en fonction de la concentration en Sm, selon la courbe représentée figure 2. Le taux maximum (1,8 divisions par heure) s'obtient pour des concentra-

(6) Voir courbe 0, fig. 1 bis, sur laquelle un doublement de d.o. est représenté par une augmentation de 1 unité sur l'échelle des ordonnées.

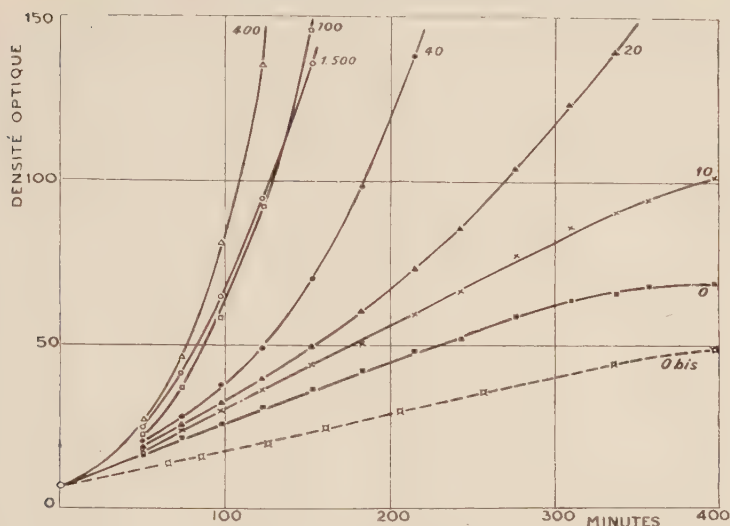


FIG. 1. — Courbes de croissance aérobie de *Bacillus cereus* S.Smb en présence d'antibiotique en concentration variable. Coordonnées normales. Les chiffres indiquent, en µg. de Sm-base par centimètre cube, les concentrations du milieu en Sm, telles qu'elles résultent des additions de Sm après dilution des cultures (voir texte). Les courbes 200 et 800, non représentées, sont presque superposables à la courbe 400.

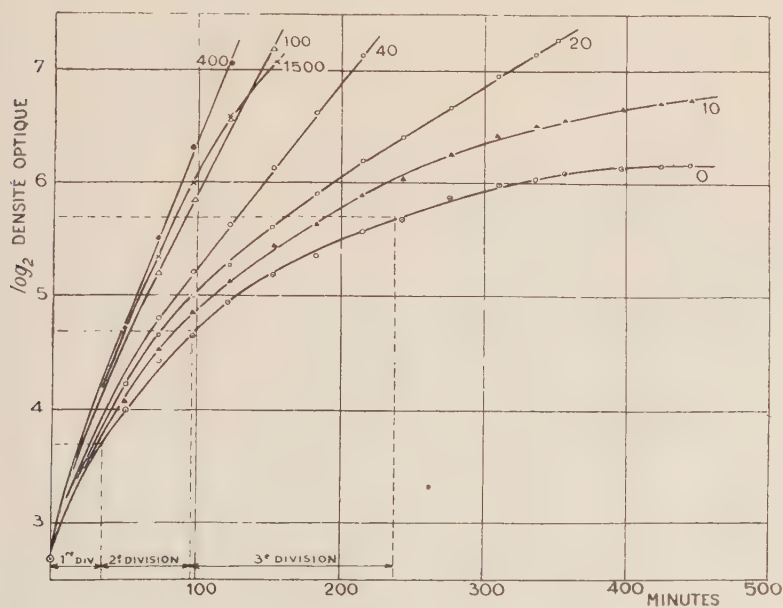


FIG. 1 bis. — Mêmes courbes de croissance que figure 1. Coordonnées semi-loga rithmiques. Pour la signification des chiffres sur les courbes, voir figure 1.

tions de Sm allant environ de 200 à 800 μg . par centimètre cube. Ces concentrations sont donc optimales.

Pour les concentrations supra-optimales, la vitesse de croissance peut être d'abord supérieure à celle observée avec les concentrations optimales (voir fig. 3), mais cette vitesse bientôt diminue, d'autant plus vite et d'autant plus fortement que la concentration en antibiotique est plus élevée. Sans doute, le taux de croissance finit-il par se stabiliser à une valeur caractéristique de la concentration en Sm, mais, dans la durée de nos expériences, cette valeur

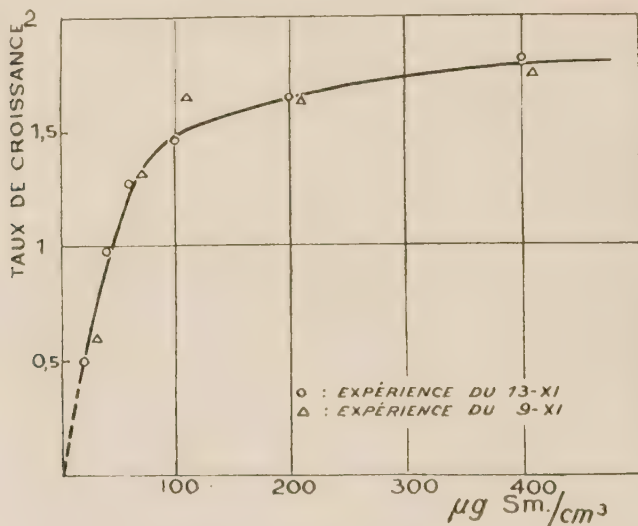


FIG. 2. — Variations du taux de la croissance aérobie en fonction de la concentration en Sm dans le milieu. L'expérience du 13 novembre est celle déjà illustrée aux figures 1 et 1 bis.

est impossible à déterminer. En conclusion, les fortes concentrations en Sm exercent sur la croissance une action inhibitrice ; que celle-ci ne se manifeste pas instantanément, peut s'expliquer simplement en admettant que la pénétration de l'antibiotique dans les cellules demande un temps non négligeable.

Certaines anomalies observées dans les valeurs des taux de croissance nous ont enfin amené à effectuer l'expérience représentée figure 3. Cette expérience comportait 13 tubes contenant la culture privée de Sm par dilution ; l'un d'eux (courbe 0 Sm) restait dépourvu d'antibiotique ; un premier groupe de 3 tubes recevait la Sm (concentration finale 40, 400 et 1.500 μg . par centimètre cube respectivement) aussitôt après la dilution ; les

3 autres groupes ne la recevaient qu'après un temps plus ou moins long de carence préalable. On voit sur la figure que lorsque l'addition de Sm est ainsi retardée, le taux de croissance caractéristique d'une concentration donnée de Sm est d'autant plus faible que la carence préalable a duré plus longtemps. Ainsi une concentration de 400 μg . de Sm par centimètre cube assure un

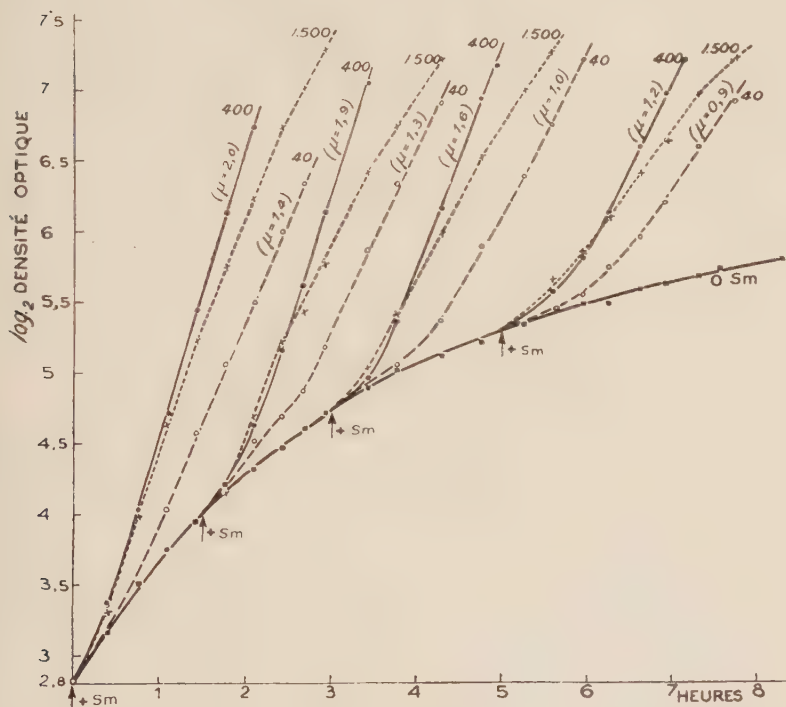


FIG. 3 — Influence de la carence préalable en Sm sur le taux de croissance aérobie en présence de diverses concentrations en Sm. La signification des chiffres sur les courbes est la même que figure 1. Entre parenthèses est indiquée la valeur du taux de croissance (μ) correspondant à la courbe voisine.

taux de croissance de 2,0 ou de 1,2, selon que l'antibiotique est ajouté aussitôt ou après cinq heures. (En prolongeant suffisamment l'expérience, il est vraisemblable que l'effet de la carence préalable finirait par s'effacer.) Cette expérience nous enseigne que le taux de croissance n'est déterminé par la concentration en Sm qu'aussi longtemps que l'on a affaire à des organismes en bon état physiologique; il est donc bien nécessaire de ne travailler que sur des bactéries en voie de croissance exponentielle.

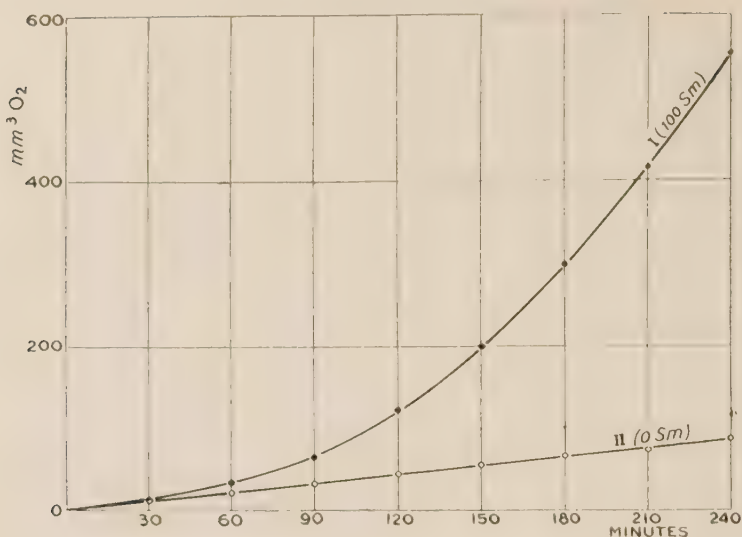


FIG. 4. — Consommation d'oxygène de *Bacillus cereus* S.SmE en absence de Sm et en sa présence ($100 \mu\text{g./cm}^2$).

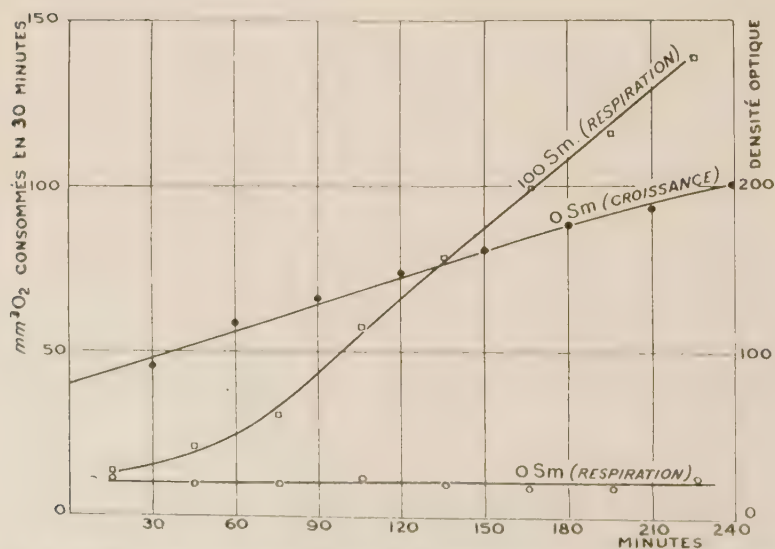


FIG. 5. — Mêmes courbes que figure 4, la respiration étant cette fois représentée par demi-heure; on a joint la courbe représentant la croissance, pendant l'expérience, dans les fioles dépourvues de Sm.

II. ETUDE DE LA RESPIRATION. — Les figures 4 à 6 illustrent les résultats d'une expérience-type. Lorsqu'on représente en fonction du temps la consommation globale d'oxygène (fig 4), on constate que celle-ci suit une courbe rapidement ascendante lorsque la Sm (100 μ g. par centimètre cube) est présente dans les fioles où respirent les bactéries (fig. 4, courbe 1), alors qu'elle est représentée par une *droite* pour les bactéries carencées en antibiotique [fig. 4, courbe 2] (7). Dans les deux cas, cependant, il y a eu croissance. Considérons d'abord le cas des bactéries exigeantes non carencées (fig. 5) : leur respiration passe de 13 mm³ pendant

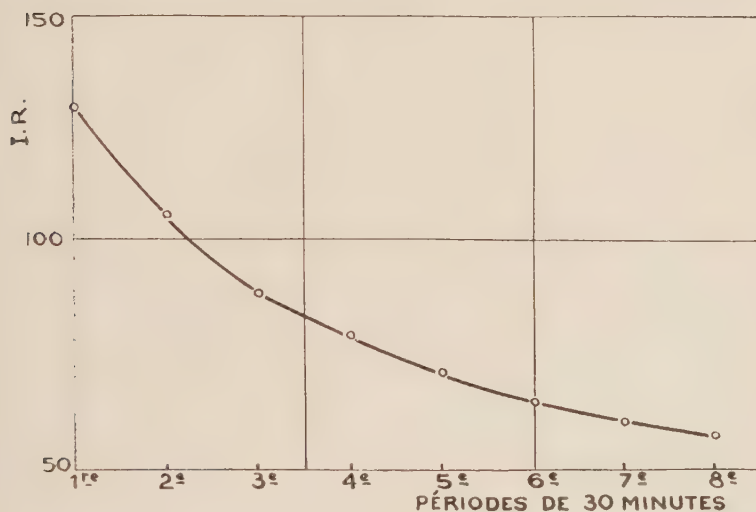


FIG. 6. — Diminution de l'intensité respiratoire IR (voir texte) au cours de la croissance résiduelle aérobie de *B. cereus* S.SmE carencé en antibiotique.

la première demi-heure à 140 mm³ pendant la huitième ; dans le même temps, la d.o. (non représentée) passe de 80 à 1.030.

(7) Il est important, dans des expériences de ce genre, de partir de bactéries ayant effectué leur croissance dans la concentration minima de Sm compatible avec un aspect normal des corps microbiens. Les bactéries sont alors « au bord » de la carence et il suffit d'éliminer la Sm du milieu pour voir s'installer aussitôt la carence avec sa croissance linéaire et sa respiration constante. Si la culture utilisée a été obtenue en présence d'un excès d'antibiotique, les bactéries doivent posséder des réserves, soit en Sm elle-même, soit en un métabolite essentiel élaboré grâce à elle ou à partir d'elle, de sorte qu'après élimination de la Sm du milieu, on assiste à une croissance qui est d'abord normale et ne prend le type de carence qu'après un temps plus ou moins long.

On peut admettre que l'intensité respiratoire IR définie par le rapport :

$$\frac{\text{consommation d'O}_2 \text{ en mm}_3 \text{ en 30 minutes}}{\text{moyenne des d. o. initiale et finale}} \times 10^3$$

est constante en présence de Sm.

Il en va tout autrement avec les bactéries carencées en Sm : alors que la d.o. (fig. 5, courbe 0 Sm croissance) passe de 80 à 200 pendant les quatre heures que dure l'expérience, la consommation d'oxygène (OSm respiration) reste bloquée à son niveau initial de 11 mm³ par demi-heure. Il s'ensuit que l'intensité respiratoire diminue constamment au cours de la croissance résiduelle des bactéries exigeantes carencées en antibiotique (fig. 6).

DISCUSSION.

Le seul exemple précédemment signalé, dans lequel la présence d'une substance connue comme antibactérienne est indispensable à la croissance d'un micro-organisme, est celui des souches mutantes sulfamido-exigeantes de *Neurospora* (Emerson [1]). Zalokar [13] a montré par la suite que l'hypersensibilité de tels mutants à l'action inhibitrice de l'acide para-aminobenzoïque (PAB) suffit à expliquer le besoin de sulfamide dont ces organismes font preuve ; le sulfamide, autrement dit, ne joue pas chez ces mutants le rôle d'un facteur de croissance métabolisé par la cellule, mais celui d'un antidote spécifique, prévenant l'auto-intoxication du mutant par l'excès de PAB qu'il produit. Chez les mutants sulfamido-exigeants, donc comme chez les souches parentes sulfamido-sensibles, le métabolite essentiel est le PAB et le sulfamide l'« analogue » antagoniste.

Dans le cas de la Sm-exigence, s'il existe un métabolite essentiel vis-à-vis duquel la Sm joue le rôle de substance antagoniste, ce métabolite ne nous est pas connu. Rhymer et coll. [9] ont, il est vrai, suggéré que ce métabolite pourrait être le lipositol ; mais ce corps n'étant pas, à l'heure actuelle, une espèce chimique définie et sa participation au métabolisme normal des bactéries Sm-sensibles restant à prouver, la suggestion de Rhymer est actuellement difficilement contrôlable (8).

Un autre fil conducteur pour l'étude du mécanisme de la Sm-exigence pourrait être suggéré par la connaissance de la signification physiologique de la libération de Sm par les organismes producteurs, ou par la connaissance du mécanisme

(8) T. F. PAINE et F. LIPMANN, dans une note (*J. Bact.*, 1949, **58**, 547) paraissant après la rédaction de cet article, ne trouvent aucune activité anti-streptomycine aux phospholipides à base d'inositol qu'ils ont étudiés.

d'action de la Sm chez les souches Sm-sensibles. Les travaux de Geiger [2] et de Umbreit [41] suggèrent un mode d'action possible de la Sm sur les souches sensibles ; mais on ignore tout de la cause de la Sm-exigence.

Nous écartérons d'abord une hypothèse que l'expérimentation réfute : celle d'une auto-intoxication des souches Sm-exigeantes par des acides gras non saturés. De tels cas sont en effet connus ; ainsi *Hemophilus pertussis*, par exemple, produit des acides gras non saturés qui inhibent sa croissance, à moins que ne soient présentes dans le milieu des substances (noir animal, lécithine, cholestérol, sérum-albumine, etc.) qui inactivent ces acides par adsorption ou formation de complexes (Pollock [8] ; Kodicek et Worden [3]). Supposant *a priori* que la Sm pouvait neutraliser l'action d'acides gras toxiques que produiraient les mutants bactériens Sm-exigeants, nous avons recherché si le cholestérol permettait la culture de ces mutants ; le résultat est négatif : même à dose massive, le cholestérol n'assure pas la croissance de la souche S.SmE de *Bacillus cereus* en absence de Sm.

Quant aux résultats consignés dans cet article, ils appellent les considérations suivantes : le fait qu'il existe une augmentation de la d.o. des cultures de bactéries Sm-exigeantes carencées en Sm, signifie que les bactéries sont encore, dans ces conditions, le siège de synthèses importantes. Nous avons pris comme critère de croissance résiduelle l'augmentation de d.o. et non la numération des germes, pour des raisons de commodité et aussi parce que la croissance résiduelle, s'accompagnant de l'apparition de chaînes d'éléments bactériens de taille anormalement grande, et peut-être multinucléés, la numération des germes risque d'être dépourvue de signification réelle. Ce qui importe, c'est qu'en absence de Sm exogène, certaines synthèses soient encore possibles, c'est que la quantité de substance vivante puisse encore augmenter, indépendamment du nombre d'organismes entre lesquels elle se trouve répartie.

L'allure linéaire de la courbe de la croissance résiduelle représentée en coordonnées normales est un phénomène remarquable qui, à notre connaissance, n'a jamais été signalé (9). La diminution constante du taux de croissance au cours de la croissance résiduelle signifie que la vitesse absolue des synthèses reste, en l'absence de Sm, bloquée au niveau qu'elle avait atteint lorsque fut installée la carence. Il faut donc que cesse, avec l'établissement de la carence en Sm, la synthèse d'un système enzymatique contrô-

(9) Il nous semble théoriquement possible qu'il s'agisse là d'un phénomène très répandu, commun peut-être à toutes les croissances résiduelles dont sont capables des bactéries en train de se carencer en un facteur de croissance.

lant la vitesse des processus anaboliques. En présence de Sm au contraire, cette synthèse est possible, et plus ou moins rapide, selon la concentration en antibiotique dans le milieu.

Les mesures manométriques de respiration rapportées dans cet article constituent un essai préliminaire en vue de l'identification de ce système enzymatique. Le fait que l'intensité respiratoire des bactéries exigeantes et carencées diminue constamment lors de leur croissance résiduelle, alors qu'elle se maintient au cours de la croissance normale en présence de Sm, signifie que l'antibiotique-facteur de croissance est nécessaire à la synthèse de l'un (au moins) des éléments constitutifs des systèmes catalytiques contrôlant l'intensité de la respiration. Mais, comme la Sm, nous l'avons vu, est également indispensable à la croissance anaérobie, nous nous trouvons placé devant l'alternative suivante : ou bien l'élément du système catalytique respiratoire, dont la biosynthèse requiert la Sm (substance X), est indispensable aux deux formes, aérobie et anaérobie, du métabolisme ; ou bien la substance X n'intervient que dans le métabolisme aérobie et, dans ce cas, il faut admettre que la Sm est également nécessaire, directement ou indirectement, à la synthèse d'un ou plusieurs autres métabolites essentiels.

RÉSUMÉ.

1° Un mutant ayant besoin de streptomycine pour sa croissance, tant aérobie qu'anaérobie, a été isolé à partir d'une souche de *Bacillus cereus*. Quelques caractères de la souche mutante sont décrits.

2° La vitesse de croissance aérobie du mutant streptomycino-exigeant est fonction de la concentration de l'antibiotique dans le milieu. Les concentrations faibles, n'assurant qu'une croissance lente, font apparaître des formes géantes filamenteuses.

3° Lorsqu'on établit une carence brusque en antibiotique, les bactéries streptomycino-exigeantes sont encore capables d'une croissance résiduelle qui représente l'équivalent de 3 à 4 divisions. Cette croissance résiduelle se fait à vitesse constamment décroissante, et la courbe qui la représente en coordonnées normales est linéaire.

4° Au cours de la croissance résiduelle des bactéries carencées, la respiration n'augmente pas. En conséquence, l'intensité respiratoire diminue constamment. La signification possible de ces faits est discutée.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] EMERSON (S.) et CUSHING (J. E.). *Feder Proceed.*, 1946, **3**, 379.
EMERSON (S.). *J. Bact.*, 1947, **54**, 195.
- [2] GEIGER (W. B.). *Arch. Biochem.*, 1947, **15**, 227.

- [3] KODICEK (E.) et WORDEN (A. N.). *Biochem. J.*, 1945, **39**, 78.
- [4] KUSHNICK (T.), RANGLES (C. I.), GRAY (C. I.) et BIRKELAND (J. M.). *Science*, 1947, **106**, 587.
- [5] LENERT (T. F.) et HOBBY (G. L.). *Am. Rev. Tub.*, 1949, **59**, 219.
- [6] MILLER (P. C.) et BOHNHOFF (M.). *Science*, 1947, **105**, 620 ; *J. Bact.*, 1947, **54**, 467.
- [7] PAINE (T. F.) et FINLAND (M.). *Science*, 1948, **107**, 143 ; *J. Bact.*, 1948, **56**, 207.
- [8] POLLOCK (M. R.). *Brit. J. exp. Path.*, 1947, **28**, 295.
- [9] RHYMER (I.), WALLACE (G. I.), BYERS (L. W.) et CARTER (H. E.). *J. biol. Chem.*, 1947, **169**, 457.
- [10] SCHAEFFER (P.). *C. R. Acad. Sci.*, 1949, **228**, 277 et 440. *Ibid.*, 1949, **229**, 1032.
- [11] UMBREIT (W. W.). *J. biol. Chem.*, 1949, **177**, 703.
- [12] YEGIAN (D.) et BUDD (V.). *J. Bact.*, 1948, **55**, 459.
- [13] ZALOKAR (M.). *Proceed. Nat. Acad. Sci.*, 1948, **34**, 32.

ÉTUDE BIOLOGIQUE DES STAPHYLOCOQUES D'ORIGINE ANIMALE

par J. PILLET, S. ISBIR et P. MERCIER (*).

(Institut Pasteur. Annexe de Garches.)

Si la distinction entre staphylocoques dorés, blancs et citrins ne semble plus maintenant mettre en évidence qu'un caractère différentiel tout à fait secondaire entre les diverses souches de ce germe, il n'est pas douteux, au contraire, que l'on puisse séparer facilement, d'une part, les staphylocoques pathogènes des non-pathogènes et, d'autre part, les souches pathogènes rencontrées chez l'homme de celles obtenues au niveau de lésions chez l'animal.

Nous décrirons ici les caractères biologiques principaux des souches d'origine animale en insistant plus particulièrement sur ceux permettant de différencier facilement ces souches de celles isolées de lésions humaines.

La mise en évidence de ces caractères différentiels présente un intérêt pathogénique, épidémiologique et thérapeutique évident. Sans insister sur ces différents points, nous par exemple que le traitement des staphylococcies animales devrait tirer un bénéfice appréciable d'une double immunisation spécifique réalisée en associant dans un même vaccin des germes isolés de lésions chez l'animal et l'anatoxine β , s'il est possible de transformer la toxine β en son dérivé anatoxique.

MATÉRIEL ET MÉTHODES. — Souches. — Nous avons étudié 41 souches isolées de lésions cutanées ou profondes chez le mouton, la vache, le chien, la chèvre et le porc (1).

Nous aurons l'occasion de comparer les résultats obtenus dans les différents tests avec ces souches et ceux enregistrés avec 500 souches d'origine humaine.

Tests. — Les différents tests employés : fermentation du mannitol, coagulase, fibrinolysine, recherche des hémolysines ont été décrits précédemment et plus particulièrement dans la thèse de l'un de nous [4].

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 5 janvier 1950.

(1) Nous remercions sincèrement le professeur Guilhaud, d'Alfort, nos collègues les D^{rs} Staub et Jacotot ainsi que le vétérinaire commandant Pigoury d'avoir bien voulu nous adresser ces souches.

Obtention et méthode de titrage de la toxine β . — Les essais destinés à obtenir la toxine β en milieu liquide ont été effectués dans les mêmes conditions et à l'aide des mêmes milieux que ceux utilisés pour la production de la toxine α [2]. Le dosage a été pratiqué en recherchant soit la dose minima hémolytique, soit la dose combinée hémolytique, en présence de globules rouges de mouton. Dans les deux cas, on doit tenir compte du fait que l'hémolyse ne se complète qu'à basse température. La lecture se fera donc après une heure d'étuve et douze heures de glacière.

Agglutination. — La technique employée, voisine de celle de Cowan [3], a été décrite récemment [4].

Identification par les bactériophages. — Un travail d'ensemble sur l'identification des staphylocoques par l'agglutination et par la lyse à l'aide de bactériophages spécifiques est actuellement en cours avec Wahl, Lapeyre et M^{lle} Fouace et fera l'objet d'une publication ultérieure. Avec leur accord, nous donnerons ici les premiers résultats obtenus avec les souches d'origine animale. On trouvera dans une note récente de Wahl et Lapeyre la description de la technique utilisée [5].

Développement en milieu synthétique. — La composition du milieu synthétique utilisé a été précisée dans la thèse de l'un de nous [6].

RÉSULTATS. — *Fermentation du mannitol.* — Sur les 41 souches testées, 33 donnent une réaction positive sur milieu de Chapman, 6 une réaction faiblement positive et 2 étaient négatives. Ces résultats font prévoir que 39 sur 41 des souches étudiées sont pathogènes, ce qu'il y a lieu de confirmer par l'épreuve de la coagulase et la recherche des hémolysines.

Coagulase. — 34 des souches éprouvées ont provoqué la coagulation totale et rapide du plasma oxalaté tandis que 3 déterminaient une coagulation partielle et 4 étaient coagulase négatives. Ces chiffres confirment donc le caractère pathogène de la majorité des souches étudiées.

En règle générale, l'élaboration de coagulase s'accompagne chez les souches d'origine humaine de la production de fibrinolyse. Il n'en est pas de même, comme nous allons le voir, en ce qui concerne les souches pathogènes prélevées sur l'animal.

Fibrinolysine. — Fait important qui confirme les observations antérieures de Miss Rountree [7] et les nôtres [8], toutes ces souches se sont révélées fibrinolysine négatives. Ce résultat met en lumière une différence essentielle entre les souches pathogènes prélevées sur l'animal et celles d'origine humaine. En effet pour ces dernières, sur 350 donnant une hémolyse marquée sur gélose au sang de lapin et coagulase +, toutes étaient fibrinolysine +, sauf 2 ; or ces 2 souches élaboraient par ailleurs de la toxine β .

Une troisième souche isolée sur l'homme semblait faire exception, mais une étude plus détaillée nous a montré qu'il s'agissait en réalité d'un mélange de 2 staphylocoques, tous deux blancs, coagulase +, sérologiquement identiques et dont l'un était α -hémolytique et fibrinolysine + alors que l'autre produisait les 2 toxines α et β et était fibrinolysine négative. On peut penser qu'une mutation s'est produite à partir d'une de ces deux formes, mais l'on sait aussi qu'en partant d'une colonie isolée, on n'est jamais sûr d'avoir affaire à des germes identiques.

Quoi qu'il en soit, il semble que le défaut de corrélation entre les deux tests fibrinolysine et coagulase est un signe différentiel important des staphylocoques d'origine animale puisqu'on le trouve dans 100 p. 100 des souches étudiées, alors que parmi celles isolées sur l'homme nous l'avons rencontré dans moins de 1 p. 100 des cas ; encore, les 3 souches présentant ce caractère élaboraient-elles la toxine β , caractéristique, comme nous allons le voir, des souches d'origine animale.

Toxinogénèse. — La recherche des hémolysines sur boîte de gélose au sang de mouton a donné les résultats suivants :

Souches α : 0. Souches β : 20. Souches $\alpha\beta$: 18.

Au contraire, avec les souches d'origine humaine, on avait enregistré les chiffres suivants :

Souches α : 347. Souches β : 0. Souches $\alpha\beta$: 3.

Ces résultats semblent donc bien montrer que l'élaboration de toxine β est propre aux souches animales, celles-ci pouvant ou non élaborer simultanément la toxine α .

Nous avons alors cherché à obtenir cette toxine en milieu liquide. Le taux de la toxine produite est toujours resté inférieur jusqu'à maintenant à celui de la toxine α . Signalons à ce propos que Glenny et Stevens [9], L. Smith [10], étudiant la même toxine, n'ont pu obtenir de filtrat hémolysant à un taux supérieur à 1/2.000. C'est à des taux comparables que nous sommes parvenus, n'obtenant qu'une fois une toxine hémolysant au 1/4.000.

La dose combinée hémolytique de nos meilleures toxines recherchée avec un sérum anti- β étalon était de 0,45 cm³, ce qui équivaut sensiblement à 4 unités provisoires, les rapports entre l'unité hémolytique et l'unité flocculante n'ayant pas encore été déterminés exactement.

Si le taux des toxines obtenues est relativement peu élevé, celles-ci paraissent posséder un pouvoir immunisant satisfaisant. En effet, un cheval ayant reçu 12 injections de toxine β , à doses croissantes (de 1 à 300 cm³), à trois jours d'intervalle, nous a fourni un sérum titrant 200 unités antitoxiques. Le formol à des doses inférieures à 6 p. 1.000 ne nous a pas permis de transformer

la toxine β en un dérivé non hémolytique, malgré un séjour d'un mois à l'étuve à 40°. A la dose de 6 p. 1.000, ce résultat a été obtenu après huit jours d'étuve mais on notait alors une perte du pouvoir de combinaison de l'ordre de 50 p. 100. Nous ne pouvons donner à ce sujet qu'une approximation, car lorsqu'on utilise des toxines ou des anatoxines de titre relativement faible, la méthode hémolytique perd de sa précision et devient difficile à interpréter, la technique par floculation étant par ailleurs inutilisable dans ces conditions. Il est donc nécessaire, avant de conclure définitivement sur ce point, de posséder des toxines plus puissantes, ce qui paraît possible par la sélection des souches et l'étude des conditions de culture et de milieux.

Agglutination. — L'identification par l'agglutination à l'aide de sérums absorbés des souches d'origine animale nous a donné les résultats suivants :

Sur 40 souches testées, nous en avons classé :

3 dans le type I.

4 dans le type II.

1 dans le type III.

1 agglutinait avec les sérums I et II.

2 agglutinaient spontanément.

29 ne réagissaient avec aucun sérum.

Si nous indiquons comparativement les résultats obtenus récemment avec 30 souches d'origine humaine, résultats qui confirment ceux précédemment enregistrés [4], nous verrons qu'il semble exister une différence marquée du point de vue de l'agglutination entre les souches pathogènes isolées sur l'animal et celles prélevées sur l'homme. En effet, pour ces dernières, une seule souche sur 30 n'a pu être classée dans un des différents types.

Ces résultats montrent que dans les conditions expérimentales choisies, les souches animales se séparent des souches humaines par une réactivité nettement moindre à l'égard des sérums préparés à l'aide de souches d'origine humaine. L'étude de l'agglutination par des sérums préparés à partir de souches animales est en cours et les résultats en seront donnés ultérieurement.

Il convient toutefois de noter qu'un certain nombre de souches animales (23 p. 100) ont pu être classées avec les sérums I, II et III et cela laisse à penser qu'il existe plus une différence quantitative que qualitative entre les agglutinogènes des souches de staphylocoques d'origine humaine et animale.

Identification par les bactériophages. — Sur 25 souches d'origine animale dont Wahl et ses collaborateurs ont recherché la sensibilité aux phages spécifiques, 14 n'ont pu être classées dans un des groupes définis par ces auteurs, aucune de ces souches n'étant lysée par les phages spécifiques amenés à la dilution critique. Parmi les 11 autres, 7 étaient sensibles au phage

« majeur » du groupe A, 2 à ceux du groupe C et 2 à celui du groupe D.

Il ressort de ces premiers résultats que la méthode d'identification des staphylocoques par les bactériophages comme celle utilisant l'agglutination spécifique, mettent en évidence parmi les souches d'origine animale une majorité de souches inclassables. Ces résultats qui s'opposent à ceux enregistrés avec les souches d'origine humaine indiquent qu'il semble exister des différences dans l'équipement antigénique des staphylocoques suivant leur origine.

Cependant le nombre relativement important des souches sensibles aux phages spécifiques à la dilution critique nous amène à faire les mêmes réserves que celles faites à propos de l'agglutination quant au caractère fondamental des différences de structure antigénique mises en évidence par l'une ou l'autre de ces méthodes.

Développement en milieu synthétique. — Nous avons obtenu un développement satisfaisant de deux souches d'origine animale sur un milieu synthétique contenant trois acides aminés, du sulfate d'ammonium, des sels et les deux facteurs de croissance du staphylocoque : aneurine et acide nicotinique. Le nombre de passages nécessaires pour obtenir une multiplication rapide à partir d'une goutte de culture a été d'une quinzaine, comparable en cela, à celui noté avec les souches d'origine humaine. Nous n'avons constaté au cours de nos essais d'adaptation de staphylocoques à ce milieu synthétique aucune différence notable entre les staphylocoques pathogènes de diverses origines.

RÉSUMÉ. — Les souches de staphylocoques d'origine animale, douées de pouvoir pathogène, fermentent le mannitol et provoquent la coagulation du plasma oxalaté d'une manière comparable aux souches d'origine humaine. Elles se différencient de ces dernières en ce qu'elles n'élaborent pas de fibrinolysine et sécrètent de la toxine β associée ou non à la toxine α . L'identification de ces souches par l'agglutination et les bactériophages spécifiques montre qu'un grand nombre d'entre elles restent inclassées, contrairement à ce que l'on constate avec les souches d'origine humaine, ce qui permet de penser qu'il existe des différences, vraisemblablement quantitatives, dans la structure antigénique de ces deux groupes de staphylocoques.

Les souches d'origine animale s'adaptent à un milieu synthétique dans les mêmes conditions que les souches isolées sur l'homme.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] PILLET (J.). Sur quelques produits élaborés par les staphylocoques pathogènes. *Thèse Fac. Méd. Paris*, 1948 (Foulon, édit.).

- [2] MERCIER (P.) et PILLET (J.). *Ces Annales*, 1947, **73**, 809.
- [3] COWAN (S. T.). *J. Path. a. Bact.*, 1939, **48**, 169.
- [4] MERCIER (P.), PILLET (J.) et M^{me} CHABANIER. Soc. Microb. Langue Franç., séance du 1^{er} décembre 1949.
- [5] WAHL (R.) et LAPEYRE (P.). Soc. Microb. Langue Franç., séance du 3 novembre 1949.
- [6] PILLET (J.). *Loc. cit.*
- [7] ROUNTREE (P.). *Austr. J. exp. Biol.*, 1947, **25**, 359.
- [8] PILLET (J.), MERCIER (P.) et PÉRY (R.). *Ces Annales*, 1948, **75**, 458.
- [9] GLENNY (A.) et STEVENS (M.). *J. Path. a. Bact.*, 1935, **40**, 201.
- [10] SMITH (M. L.) et PRICE (S.). *J. Path. a. Bact.*, 1938, **47**, 361.

ÉTUDES SUR LE MÉCANISME DE LA FERMENTATION ACÉTONO-BUTYLIQUE

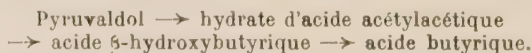
III. — FORMATION DE BUTYRATE A PARTIR DE β -HYDROXYBUTYRATE ET D'ACÉTYLACÉTATE

par GERMAINE COHEN-BAZIRE et GEORGES N. COHEN.

(Institut Pasteur. Annexe de Garches.)

Lemoigne [1, 2] a été le premier à montrer la production d'acide β -hydroxybutyrique à partir de glucose dans des fermentations bactériennes : le bacille M, aérobic strict, voisin de *B. megatherium*, accumule, sous forme de réserves, un « lipide » β -hydroxybutyrique.

Schoen [3] avait émis l'hypothèse que le β -hydroxybutyrate était un intermédiaire possible dans la fermentation acétono-butylique. Johnson, Peterson et Fred [4], sur la base d'expériences en culture avec *Cl. acetobutylicum*, avaient rejeté ce point de vue : le β -hydroxybutyrate, ajouté à des cultures fermentant vigoureusement le glucose ne provoquait pas d'accroissement de la formation d'acétone ou de corps en C_4 . Ces auteurs ont également essayé d'isoler le β -hydroxybutyrate à partir de cultures fermentant le glucose, sans y parvenir. Peldan [5], dans le cadre de la théorie du pyruvaldol, postule que le β -hydroxybutyrate est un intermédiaire dans la formation de l'acide butyrique :



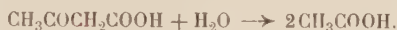
Cependant, Peldan n'apporte aucune preuve expérimentale à l'appui de son hypothèse ; d'autre part, dans son schéma, le β -hydroxybutyrate ne donne que du butyrate comme acide volatil. Nous reviendrons sur ce point dans la partie expérimentale.

Davies [6] ne note aucun échange gazeux par la technique de Warburg en présence de β -hydroxybutyrate et de suspensions de *Cl. acetobutylicum*. Il ne recherche pas s'il s'est formé des acides volatils.

Nous voyons donc qu'il n'a pas été décrit d'expériences où des acides volatils aient été trouvés après incubation de ce substrat avec des suspensions lavées de bactéries butyriques ou acétono-butyliques.

D'autre part, tous les auteurs admettent que l'acétylacétate est un intermédiaire dans la formation de l'acétone par les bactéries acétono-butyliques. Johnson, Peterson et Fred [4] l'ont montré avec des suspensions lavées de *Cl. acetobutylicum* et Davies [7] a étudié les caractéristiques de l'enzyme responsable de la décarboxylation de l'acétylacétate par le même organisme.

On ne trouve pas, par contre, dans la littérature de formation d'acides volatils à partir d'acétylacétate, en ce qui concerne les bactéries butyriques ou acétono-butyliques. Lehninger [8] note le premier avec *E. coli* une scission hydrolytique enzymatique de l'acétylacétate en 2 molécules d'acétate, selon :



Stadtman et Barker [9] décrivent une hydrolyse phosphoroclastique analogue avec *Terminosporus kluyveri* (*Cl. kluyveri*) :



Davies [6] note que le glucose est incapable de réduire l'acétylacétate en butyrate sous l'influence des suspensions de *Cl. acetobutylicum*. Il n'observe pas non plus de scission hydrolytique de l'acétylacétate.

Dans trois notes préliminaires [10, 11, 12], nous avons montré que le β -hydroxybutyrate et l'acétylacétate sont métabolisés par les bactéries butyriques et acétono-butyliques. Dans ce travail, qui est un développement de ces trois notes, nous étudions les modalités de la formation des acides acétique et butyrique à partir des acides β -hydroxybutyrique et acétylacétique.

PARTIE EXPÉRIMENTALE.

Obtention des suspensions bactériennes, dosages d'azote, de pyruvate et d'acides volatils : voir le premier mémoire de cette série [13].

Dosages de β -hydroxybutyrate : méthode de Shaffer [14] dans un appareil rodé.

Dosages d'acétylacétate et d'acétone : Ces deux corps sont dosés sous forme d'acétone par la méthode de Messinger [15], dans un appareil rodé. Quand le substrat est le β -hydroxybutyrate, on a une estimation de la somme acétylacétate + acétone. Quand le substrat est l'acétylacétate, l'acétylacétate disparu rend compte des acides volatils apparus ; il n'importe donc pas qu'une partie de l'acétylacétate se soit transformée en acétone.

Dosages de lactate : méthode de Friedemann, Cotonio et Shaffer [16], dans l'appareil de Lieb et Zacherl [17].

Produits utilisés : Acétylacétate de potassium, préparé selon Friedmann [18]. β -hydroxybutyrate de sodium, préparé selon

Wislicenus [19]. Lactate de sodium, arsénite de sodium, fluorure de sodium, chlorhydrate d'hydroxylamine : Prolabo.

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX.

A. FERMENTESCIBILITÉ DU β -HYDROXYBUTYRATE. — Les suspensions « normales » et « déficientes » [13] fermentent le β -hydroxybutyrate en donnant les acides butyrique et acétique, en même temps que de faibles quantités d'acétone. La production de butyrate à partir de β -hydroxybutyrate est donc indépendante du caractère « normal » ou « déficient » de la souche employée. L'acide butyrique représente, suivant les expériences, de 33 à 58 p. 100 de l'acidité volatile totale.

L'hydroxylamine, l'arsénite et le fluorure diminuent la quantité totale d'acides volatils formés à partir de β -hydroxybutyrate, sans modifier notablement le rapport des acides butyrique et acétique. Tous ces résultats sont consignés dans le tableau I.

TABLEAU I. — Fermentescibilité du β -hydroxybutyrate.

Le nombre de milligrammes d'azote bactérien par tube figure sous le nom de la souche utilisée. Tampon phosphate M/30 à pH 7. Volume total 20 ml. Durée de l'incubation : 20 heures. Le chlorhydrate d'hydroxylamine est neutralisé avant son utilisation.

SOUCHE UTILISÉE	β -HYDROXYBUTYRATE initial (micromoles)	INHIBITEUR	β -HYDROXYBUTYRATE consommé (micromoles)	ACÉTOXE (micromoles)	AVT (micromoles)	BUTYRATE (micromoles)	ACÉTATE (micromoles)	BUTYRATE p. 100
I. PC48 (4,2 mg.)	3.200	NH ₂ OH : 10 ⁻³ M	1.200	37	1.560	900	660	5
II. PC48 (4,3 mg.)	3.200		920	75	1.196	598	598	5
III. PC48 (3,5 mg.)	2.500		Non dosé	23	1.586	682	904	4
IV. GR4 (7 mg.)	3.200	NH ₂ OH : 10 ⁻³ M	1.525	12	2.132	948	1.184	4
V. GR4 (7,3 mg.)	3.200		1.490	50	1.352	595	757	4
VI. FD11 (5,65 mg.)	3.000		1.412	15	1.820	855	965	4
	3.200	Arsénite : 40 ⁻³ M	453	33	554	236	318	4
	3.200	Fluorure : 4,5 \times 10 ⁻³ M	Non dosé	20	520	200	320	3
	3.000		Non dosé	10	1.030	343	686	3

AVT. Acidité volatile totale.

B. FERMENTESCIBILITÉ DE L'ACÉTYLACÉTATE. — Les suspensions « déficientes » hydrolysent à peu près quantitativement l'acétyl-

acétate en acétate. Les suspensions « normales » produisent, à partir d'acétylacétate, outre de l'acide acétique, une proportion notable d'acide butyrique, ce qui montre l'existence dans ces suspensions de donateurs d'hydrogène intracellulaires. Ces donateurs ne sont d'ailleurs pas générateurs d'acides volatils par eux-mêmes, les suspensions seules donnant des valeurs d'acidité volatile négligeables.

L'arsénite inhibe très fortement, et avec toutes les souches, la quantité d'acides volatils formés à partir d'acétylacétate, sans changer la proportion d'acide butyrique formé sous l'influence des donateurs d'hydrogène, dans le cas des souches « normales ».

Le fluorure inhibe également la quantité d'acides volatils formés à partir d'acétylacétate; de plus, il inhibe la réduction de ce dernier par les donateurs endogènes dans le cas des suspensions « normales ».

Les résultats relatifs à ces expériences seront trouvés dans le tableau II.

TABLEAU II. — Fermentescibilité de l'acétylacétate.

Mêmes conditions que dans le tableau I.

SOUCHES UTILISÉES	ACÉTYL CÉTATE initial (micromoles)	INHIBITEUR	ACÉTYLACÉTATE consommé (micromoles)	ACIDITÉ VOLATILE totale (micromoles)	BUTYRATE (micromoles)	ACÉTATE (micromoles)	BUTYRATE P. 100 de l'A. V. T.
I. PC48 (4 mg.)	1.935		796	1.482	0	1.482	0
II. PC48 (4 mg.)	1.935		819	1.274	0	1.274	0
III. L41 (7,3 mg.)	1.000		Non dosé.	1.040	0	1.04	0
IV. GR4 (7 mg.)	1.935		835	1.378	372	1.006	27
V. GR4 (7 mg.)	1.935		792	1.040	374	666	36
VI. GR4 (7,3 mg.)	1.935	Arsénite : 10^{-3} M Fluorure : $4,5 \times 10^{-3}$ M	747	1.131	350	781	11
	1.935		277	433	160	273	36,8
	1.935		432	572	95	477	16,6

C. PRODUCTION DE BUTYRATE DUE A LA RÉDUCTION DE L'ACÉTYLACÉTATE PAR LE LACTATE. — Le fait que les suspensions « normales » réduisent partiellement l'acétylacétate donne à penser qu'en présence d'un substrat réducteur approprié, l'acétylacétate peut donner naissance à des quantités importantes de butyrate. Il est peu vraisemblable que le donateur endogène soit le pyruvate, auquel cas les suspensions seules donneraient une acidité

volatile appréciable. Nous avons alors essayé le lactate qui n'est pas fermenté seul [20].

La différence entre suspensions « normales » et « déficientes » subsiste ici, à l'encontre de ce qui se passe avec le β -hydroxybutyrate : le lactate ne réduit l'acétylacétate qu'avec les suspensions « normales ». Le rendement en acide butyrique est de 27 à 36 p. 100 de l'acidité volatile totale avec l'acétylacétate seul ; il devient, en présence de lactate et d'acétylacétate, égal à 59-66 p. 100 de cette acidité. On peut envisager soit une réduction directe de l'acétylacétate, soit une hydrolyse préalable de l'acétylacétate en acétate suivie d'une formation de butyrate à partir du couple lactate-acétate ; cette dernière réaction est réalisable par les suspensions « normales », comme nous l'avons montré précédemment [20]. Les bilans des expériences du tableau III montrent qu'il s'agit principalement d'une réduction de l'acétylacétate en butyrate. En effet, si l'acétylacétate était préalablement hydrolysé, il donnerait 2 molécules d'acétate par molécule. Pour des quantités constantes de lactate, on devrait obtenir moins de butyrate en présence d'acétylacétate qu'en présence d'acétate. Or, alors que le couple lactate-acétate fournit un mélange d'acides acétique et butyrique dans lequel la proportion d'acide butyrique varie de 33 à 50 p. 100 [20], le couple lactate-acétylacétate fournit de 59 à 66 p. 100 de butyrate. On verra d'ailleurs au paragraphe suivant la description d'expériences qui suggèrent la réduction directe de l'acétylacétate.

L'arsénite inhibe la donation d'hydrogène par le lactate dans le couple lactate-acétylacétate : le lactate n'est pas consommé et il n'y a pas de formation supplémentaire d'acide butyrique ; la réduction de l'acétylacétate par les donateurs endogènes n'est pas affectée par l'arsénite, comme nous l'avons déjà vu.

Le fluorure inhibe la réduction de l'acétylacétate par le lactate ; nous avons déjà noté que la réduction de l'acétylacétate par les donateurs endogènes est également inhibée par le fluorure. On trouvera dans le tableau III les résultats correspondant à ce paragraphe.

D. PRODUCTION DE BUTYRATE DUE A LA RÉDUCTION DE L'ACÉTYLACÉTATE PAR LE PYRUVATE. — Les suspensions « normales », donnant du butyrate avec le pyruvate [43] et avec l'acétylacétate seul, une formation supplémentaire de butyrate par incubation simultanée des deux substrats ne peut être détectée avec sécurité. Par contre, les suspensions « déficientes » ne donnent, à partir de pyruvate [43] ou d'acétylacétate, que de l'acide acétique. Si on incube ces deux substrats simultanément avec des suspensions « déficientes », on observe une réduction de l'acétylacétate en butyrate par le pyruvate. Cette dernière expérience constitue un

TABLEAU III. — Réduction de l'acétylacétate par le lactate.

Mêmes conditions que dans le tableau I.

SOUCHE UTILISÉE	ACÉTYLACÉTATE Initial (micromoles)	LACTATE Initial (micromoles)	INHIBITEUR	ACÉTYLACÉTATE consommé (micromoles)	LACTATE consommé (micromoles)	AVT (micromoles)	BUT. (micromoles)	ACÉT. (micromoles)	BUT. p. 400 de l'AVT.
P. C48	1.935	0		796		1.482	0	1.482	0
4 mg.)	1.935	2.000		579	0	1.040	0	1.040	0
I. GR 4	1.935	0		835		1.378	372	1.006	27
7 mg.)	1.935	2.000		912	984	1.170	772	398	66
I. GR 4	1.935	0		792	Non dosé.	1.040	374	666	36
7 mg.)	1.935	2.000		487	Non dosé.	949	617	332	65
	1.935	0		747		1.131	350	781	31
V. GR 4	1.935	2.000		618	539	949	560	389	59
3 mg.)	1.935	2.000	Arsénite : 10^{-3} M	210	0	346	124	222	36
	1.935	2.000	Fluorure : $1,5 \times 10^{-3}$ M	230	0	433	94	339	21,7

VT., acidité volatile totale; But., butyrate; Acét., acétate.

argument supplémentaire en faveur de la réduction directe de l'acétylacétate suggérée dans la formation de butyrate à partir du couple lactate-acétylacétate. En effet, si l'acétylacétate ne subissait qu'une hydrolyse en acétate, on n'obtiendrait que de l'acétate à partir du couple pyruvate-acétylacétate et de suspensions déficientes.

L'arsénite, tout en inhibant légèrement l'acidité volatile totale, augmente la valeur absolue et la proportion relative d'acide butyrique formé. Ce fait peut être interprété facilement quand on sait, comme nous l'avons vu, que l'arsénite inhibe la scission hydrolytique de l'acétylacétate par les souches « déficientes ». Ce résultat permet d'interpréter avec certitude l'action de l'arsénite sur la fermentation du pyruvate par les souches « normales » [13, 21] : il s'agit bien d'une inhibition de la condensation de deux restes en C_2 en un composé en C_4 ; si le composé en C_4 est fourni préformé, l'arsénite n'inhibe pas sa réduction en butyrate.

Le fluorure n'a aucune action sur l'acidité volatile totale à partir du couple pyruvate-acétylacétate; il n'exerce aucune modification sensible du rapport butyrate/acétate. On voit donc ici que le fluorure qui empêche la réduction de l'acétylacétate par le lactate (suspensions « normales ») ne l'empêche pas si le réducteur est le pyruvate (suspensions « déficientes »).

Rappelons que le fluorure est sans action sur la production de butyrate à partir de pyruvate [13].

Les chiffres correspondant à la réduction de l'acétylacétate par le pyruvate se trouvent dans le tableau IV.

TABLEAU IV — Souche « déficiente » PC 48 (4 mg. d'azote bactérien par tube). Réduction de l'acétylacétate par le pyruvate.

Mêmes conditions que dans le tableau I.

	PYRUVATE initial (micromoles)	ACÉTYLACÉTATE initial (micromoles)	INHIBITEUR	PYRUVATE disparu (micromoles)	ACÉTYLACÉTATE disparu (micromoles)	AVT. (micromoles)	BUT. (micromoles)	ACÉT. (micromoles)	BUT. p. 100 de l'AVT.
I. 0	800				Non dosé.	1 400	100	1 000	9
2 000	0			Non dosé.	1 092	52	1 040	4,7	
2 000	80			Non dosé.	1 729	565	1 164	32,7	
II. 0	7,6				600	1 060	62	998	5,8
2 000	0			547		510	0	510	0
2 000	756			508	666	1 174	288	8,6	25
2 000	7 6		Arsénite 10^{-3} M	Non dosé.	514	852	370	482	43,5
2 000	756		Fluorure : $1,5 \times 10^{-3}$ M	540	690	1 131	367	764	62,5

E. ACCROISSEMENT DE LA QUANTITÉ DE BUTYRATE FORMÉE EN PRÉSENCE DE LACTATE ET DE β -HYDROXYBUTYRATE. — Avec les suspensions « normales », la proportion de butyrate qui atteint jusqu'à 50 p. 100 de l'acidité volatile totale en présence de β -hydroxybutyrate seul atteint jusqu'à 72 p. 100 si des quantités équimoléculaires de lactate et de β -hydroxybutyrate sont incubées simultanément. Cette formation supplémentaire d'acide butyrique est supprimée aussi bien par l'arsénite que par le fluorure (voir le tableau V).

TABLEAU V. — Réduction du β -hydroxybutyrate par le lactate.

Mêmes conditions que dans le tableau I.

SOUCHE UTILISÉE	β -HYDROXYBUTYRATE initial (micromoles)	LACTATE initial	INHIBITEUR	β -HYDROXYBUTYRATE consommé (micromoles)	LACTATE consommé	AVT. (micromoles)	BUT. (micromoles)	ACÉT. (micromoles)	BUT. p. 100 de l'AVT.
I. GR 4 (7 mg)	3 200	0		1 525	0	2 132	948	1 184	4
	3 200	2 866		Non dosé.	532	2 080	1 407	583	7
	3 200	0		1 412	0	1 820	855	965	4
II. GR 4 (7,3 mg)	3 200	2 866		Non dosé.	661	1 438	960	480	6
	3 200	2 866	Arsénite : 10^{-3} M	Non dosé.	0	400	144	256	2
	3 200	2 866	Fluorure : $1,5 \times 10^{-3}$ M	Non dosé.	0	641	242	400	2

F. RÉSUMÉ DE L'ACTION DES INHIBITEURS. — a) *Arsénite*. — Inhibition de la condensation des restes en C_2 en corps en C_4 ([13, 21], ce travail).

Inhibition de la réduction par le lactate : réaction lactate-acétate [20] ; réaction lactate-acétylacétate (ce travail) ; réaction lactate- β -hydroxybutyrate (ce travail).

Non-inhibition de la réduction de l'acétylacétate par les donateurs endogènes (ce travail).

Non-inhibition de la réduction de l'acétylacétate par le pyruvate (ce travail).

b) *Fluorure*. — Non-inhibition de la condensation des restes en C_2 en corps en C_4 [13].

Inhibition de la réduction par le lactate : réaction lactate-acétate [20] ; réaction lactate-acétylacétate (ce travail) ; réaction lactate- β -hydroxybutyrate (ce travail).

Inhibition de la réduction de l'acétylacétate par les donateurs endogènes (ce travail). Non-inhibition de la réduction de l'acétylacétate par le pyruvate.

On peut déduire facilement de ce résumé que les donateurs d'hydrogène intracellulaires qui réduisent partiellement l'acétylacétate dans le cas des suspensions « normales » ne sont ni le pyruvate ni le lactate. Il s'agit peut-être d'autres métabolites réducteurs ou d'hydrogène moléculaire.

DISCUSSION.

Si nous voulons résumer les faits relatifs au mécanisme de la production d'acide butyrique à partir de pyruvate, nous nous trouvons en présence de multiples données que nous allons essayer de résumer.

A. Koepsell et Johnson [22] ont vu qu'un extrait de *Cl. butylicum* fermente le pyruvate selon :



Koepsell, Johnson et Meek [23] ont par la suite montré que cette réaction se fait par l'intermédiaire de l'acétylphosphate selon :



Ces résultats ainsi que ceux de Simon [24, 25] et de nombreux autres auteurs, et nos propres résultats avec les suspensions « déficientes », laissent entendre que l'acide acétique (ou l'acétylphosphate) est le produit primaire de l'attaque du pyruvate par les suspensions de bactéries butyriques ou acétono-butyliques.

B. Du point de vue thermodynamique on peut admettre avec

Lipmann [26] que la transformation de l'acétate en acétylacétate se fasse selon :



Cette réaction est la réaction inverse de celle découverte par Stadtman et Barker [9] avec un extrait de *T. kluveri* (*Cl. kluveri*). Nos propres résultats sur la formation de butyrate à partir d'acétylacétate rendent probable l'hypothèse de Lipmann relative à l'acétylacétate comme intermédiaire.

Cependant, Stadtman et Barker, travaillant avec un extrait de *T. kluveri* [27] capable de fournir du butyrate à partir d'acétylphosphate, d'acétate et d'hydrogène ont vu qu'en présence d'acétylacétate et d'hydrogène, cet extrait ne donnait pas naissance à du butyrate, mais seulement à du β -hydroxybutyrate, non ultérieurement métabolisé [29].

D'autre part [29, 30], l'oxydation de butyrate marqué sur le carboxyle en présence d'acétylacétate non marqué donne naissance à de l'acétylphosphate et à de l'acétate marqués sur le carboxyle sans que l'acétylacétate trouvé en fin de réaction soit marqué [29]. Ces expériences de Stadtman et Barker semblent montrer que l'acétylacétate n'est pas un intermédiaire dans la formation de l'acide butyrique par *T. kluveri*.

Nous avons montré dans ce travail que, contrairement à ce qui se passe avec *T. kluveri* [29], les suspensions des germes que nous avons utilisés peuvent réduire l'acétylacétate en butyrate. Il est évident que ceci ne suffit pas à prouver que l'acétylacétate soit un intermédiaire réel de la synthèse du butyrate à partir de pyruvate. Il serait indiqué que des expériences identiques à celles de Stadtman et Barker soient effectuées avec nos suspensions en utilisant des molécules marquées avec du carbone radioactif, afin de déterminer si les résultats de ces auteurs excluant l'acétylacétate comme intermédiaire sont d'une portée générale.

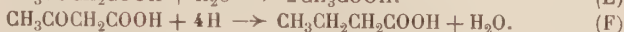
C. Nous avons montré que l'acétylacétate en présence d'un donateur d'hydrogène convenable peut être réduit en butyrate selon :



Le donateur d'hydrogène peut être soit le lactate dans le cas des suspensions « normales », soit le pyruvate dans le cas des suspensions « déficientes » et vraisemblablement aussi dans le cas des suspensions « normales ». Des donateurs d'hydrogène intracellulaires non identifiés ou peut-être l'hydrogène moléculaire peuvent réduire l'acétylacétate en butyrate dans le cas des suspensions « normales ».

Le β -hydroxybutyrate fournit seul des quantités d'acide buty-

rique importantes. Il est inutile d'ajouter un donateur d'hydrogène ; il est évident que le β -hydroxybutyrate joue à la fois le rôle de donateur d'hydrogène et de générateur du corps accepteur d'hydrogène. Nous proposons pour la fermentation du β -hydroxybutyrate le schéma suivant :



La réaction globale (D) + (E) + (F) devient alors :



La réaction (G) correspond à 33 p. 100 d'acide butyrique. Les valeurs plus fortes observées peuvent correspondre à la réduction de l'acétylacétate par des donateurs endogènes.

Si l'on ajoute au β -hydroxybutyrate un donateur d'hydrogène tel que le lactate, on obtient une proportion de butyrate encore plus élevée.

D. L'action des inhibiteurs semble exclure le lactate comme intermédiaire de la synthèse du butyrate à partir de pyruvate.

E. La somme des réactions (B) + (C) donne :



Cohen et Cohen-Bazire [40] avaient obtenu des résultats négatifs en incubant de l'acétate avec des suspensions de bactéries butyriques en atmosphère d'hydrogène. Stadtman et Barker [28], en incubant des extraits de *T. kluyveri* avec de l'acétate et de l'acétylphosphate en présence d'hydrogène, ont vu se former d'importantes quantités de butyrate, ce qui semble légitimer l'équation globale (H), quoique d'après ces auteurs les deux réactions partielles conduisant à (H) ne représentent pas la réalité dans leur cas. Dans notre cas cependant, l'équation (C) est réalisée en prenant le lactate ou le pyruvate comme donateurs d'hydrogène. Des expériences sont en cours qui permettront de déterminer si les organismes « normaux » que nous utilisons sont capables de transformer (acétylphosphate + acétate) en acétylacétate (équation B) et s'ils possèdent une hydrogénase capable d'utiliser l'hydrogène moléculaire pour la réduction de l'acétylacétate.

Avec nos suspensions, il nous a été impossible de détecter de formation substantielle d'acétylphosphate. Cependant, Nisman [31] utilisant des extraits de *Cl. saccharobutyricum* GR4 obtenus par ultrasonation a pu montrer une formation importante d'acétylphosphate à partir de pyruvate (équation A).

RÉSUMÉ.

Nous avons étudié la fermentescibilité du β -hydroxybutyrate et de l'acétylacétate par les suspensions « normales » et « déficientes » de bactéries butyriques et acétono-butyliques.

Nous avons étudié les modalités de la réduction de l'acétylacétate par le lactate et par le pyruvate, ainsi que la réduction du β -hydroxybutyrate par le lactate.

L'action de l'arsénite et du fluorure sur ces diverses réactions a été étudiée.

Nous avons discuté, en fonction de nos résultats, la possibilité pour l'acétylacétate d'être un intermédiaire dans la synthèse du butyrate à partir du pyruvate.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] LEMOIGNE (M.). *C. R. Acad. Sci.*, 1923, **176**, 1761.
- [2] LEMOIGNE (M.). *Ces Annales*, 1925, **39**, 144.
- [3] SCHOEN (M.). *Le problème des fermentations*, Paris, 1926.
- [4] JOHNSON (M. J.), PETERSON (W. H.) et FRED (E. B.). *J. Biol. Chem.*, 1933, **101**, 145.
- [5] PELDAN (H.). *Biochem. Zeitschr.*, 1941, **309**, 108.
- [6] DAVIES (R.). *Biochem. J.*, 1942, **36**, 582.
- [7] DAVIES (R.). *Biochem. J.*, 1943, **37**, 230.
- [8] LEHNINGER (A. L.). *J. Biol. Chem.*, 1942, **143**, 147.
- [9] STADTMAN (E. R.) et BARKER (H. A.). *J. Biol. Chem.*, 1948, **174**, 1039.
- [10] COHEN (G. N.) et COHEN-BAZIRE (G.). *Nature*, London, 1948, **162**, 578.
- [11] COHEN (G. N.) et COHEN-BAZIRE (G.). VIII^e Congrès de Chimie biologique, Paris, 1948. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1949, **31**, 374.
- [12] COHEN (G. N.) et COHEN-BAZIRE (G.). *C. R. Acad. Sci.*, 1949, **228**, 1531.
- [13] COHEN-BAZIRE (G.) et COHEN (G. N.). *Ces Annales*, 1949, **77**, 718.
- [14] SHAFFER (P. A.). *J. Biol. Chem.*, 1908, **5**, 211.
- [15] MESSINGER (J.). *Ber.*, 1888, **21**, 3366.
- [16] FRIEDEMANN (T. E.), COTONIO (M.) et SHAFFER (P. A.). *J. Biol. Chem.*, 1927, **73**, 335.
- [17] LIEB (H.) et ZACHERL (M. K.). *Zeitschr. physiol. Chem.*, 1932, **211**, 211 ; 1935, **231**, 88.
- [18] FRIEDEMANN (E.). *Biochem. Zeitschr.*, 1931, **243**, 125.
- [19] WISLICENUS (J.). *Ann. Chem.*, 1889, **250**, 224.
- [20] COHEN (G. N.) et COHEN-BAZIRE (G.). *Ces Annales*, 1949, **77**, 729.
- [21] COHEN-BAZIRE (G.), COHEN (G. N.), NISMAN (B.) et RAYNAUD (M.). *C. R. Soc. Biol.*, 1948, **142**, 1221.
- [22] KOEPSSELL (H. J.) et JOHNSON (M. J.). *J. Biol. Chem.*, 1942, **145**, 379.
- [23] KOEPSSELL (H. J.), JOHNSON (M. J.) et MEEK (J. S.). *J. Biol. Chem.*, 1944, **154**, 535.
- [24] SIMON (E.). *Nature*, London, 1943, **152**, 626.
- [25] SIMON (E.). *Arch. Biochem.*, 1947, **14**, 39.
- [26] LIPMANN (F.). *Adv. Enzymol.*, 1946, **6**, 231.

- [27] STADTMAN (E. R.) et BARKER (H. A.). *J. Biol. Chem.*, 1949, **180**, 1085.
- [28] STADTMAN (E. R.) et BARKER (H. A.). *J. Biol. Chem.*, 1949, **180**, 1117.
- [29] STADTMAN (E. R.) et BARKER (H. A.). *J. Biol. Chem.*, 1949, **180**, 1169.
- [30] STADTMAN (E. R.) et BARKER (H. A.). *J. Biol. Chem.*, 1949, **180**, 1095.
- [31] NISMAN (B.). *C. R. Acad. Sci.*, 1950, **230**, 248.



LA RÉACTION DE HIRST APPLIQUÉE A LA RECHERCHE DES ANTICORPS DANS LA MALADIE DE NEWCASTLE

par GEORGETTE CORDIER, JEAN CLAVIERAS et AZIZ OUNAIS.

(Laboratoire de l'Institut Arloing, Tunis.)

Les résultats satisfaisants qui avaient marqué nos essais d'immunisation contre la maladie de Newcastle en Tunisie, appelaient des recherches sur la possibilité de déceler des anticorps dans le sang des volailles vaccinées.

La particularité qui s'attache à l'étude du virus de cette affection, à savoir son caractère d'hémo-agglutinabilité vis-à-vis des hématies normales de poule et qui conditionne la réaction de Hirst, était exploitée à ces fins.

Nos essais avaient pour but : 1° de rechercher l'influence sur la réaction de Hirst de sérums récoltés sur des oiseaux vaccinés à différents intervalles, après la vaccination ou après une atteinte de peste ; 2° d'utiliser éventuellement les résultats obtenus à la détermination du degré et de la durée de l'immunité, afin d'en déduire le pouvoir protecteur du vaccin sans recourir à l'épreuve de virulence sur l'animal.

TECHNIQUE DE LA RÉACTION. — La réaction est celle qui est appliquée au diagnostic de la grippe comme à celui de la peste aviaire et de la maladie de Newcastle ; elle a été particulièrement bien exposée par Lépine et ses collaborateurs [1].

Il suffit d'en rappeler le principe et d'indiquer les facteurs auxquels il est fait appel.

Dans la réaction de Hirst, des suspensions virulentes de dilutions croissantes selon une progression géométrique de raison 2, mises en présence d'un égal volume de suspension d'hématies de poulet, sont capables, jusqu'à une certaine dilution, qui varie avec la qualité du virus, d'agglutiner ces hématies. L'entrée en jeu d'un sérum porteur d'anticorps spécifiques a pour effet, lorsqu'il est ajouté au virus avant l'adjonction des globules rouges, d'empêcher le phénomène de l'agglutination par neutralisation du virus.

La réaction est donc basée sur l'intervention : 1° du sérum dans lequel sont recherchés les anticorps, sérum également utilisé en dilutions croissantes selon une progression géométrique de raison 2, la dilution de départ étant 1/40 ; 2° du virus de titre

connu dilué à un taux quatre fois plus fort que celui du dernier tube positif dans la réaction de titrage de cet antigène. L'antigène qui a servi à cette étude était constitué par le mélange de liquides amnio-allantoidiens d'une même récolte, dont le titre hém-agglutinant était égal à $\frac{1}{2.048}$; la dilution retenue dans ce cas était

$\frac{1}{512}$;

3° D'une suspension d'hématies de volailles à 0, 5 p. 100.

Le véhicule utilisé dans ces diverses préparations était une solution saline de chlorure de sodium à 8,5 g. de sel par litre. La mise en présence des éléments était effectuée dans l'ordre suivant : sérum, antigène, hématies, par série de 6 à 8 tubes pour un volume constant dans chaque tube. Les tubes étaient bien agités, puis abandonnés à eux-mêmes à la température du laboratoire pendant une heure et demie. Selon qu'il s'agissait d'un sérum doué ou non d'un pouvoir inhibant, la réaction offrait l'un des aspects suivants :



EXPÉRIMENTATION. — Les sérums provenaient :

1° De volailles vaccinées par double vaccination à huit jours d'intervalle, à l'aide de vaccins par virus adsorbé soit sur carbone, soit sur alumine, soit avec du vaccin gras formolés dont la valeur a été précédemment établie [1] et qui étaient récoltés à des intervalles plus ou moins éloignés de la date de vaccination ;

2° De ces mêmes sujets après qu'ils avaient subi, sans dommage apparent, l'épreuve destinée à fixer leur état d'immunité ;

3° De quelques sujets guéris de peste naturelle ou de la maladie expérimentale.

Les épreuves ont été réalisées de trois façons :

a) Par cohabitation en parquet infecté avec des malades et des témoins ;

b) Par inoculation intramusculaire de 120.000 doses mortelles de virus ;

c) Par dépôt de virus sur des scarifications effectuées simultanément sur la crête et les barbillons, ces différentes épreuves ayant toujours entraîné la mort des témoins.

La recherche du test d'inhibition appliquée au sérum des oiseaux vaccinés a fourni les valeurs suivantes :

TABLEAU I. — Volailles vaccinées depuis un mois (temps compté après le deuxième vaccin) au moment où elles sont éprouvées par cohabitation.

VACCINATIONS des 1 ^{er} et 16 février		TEST			TEST			
		du 16 février	du 14 mars		du 6 mai	du 6 juin	du 7 juillet	du 11 août
Vaccin carbone.	Vol. 1	0	0	Epreuve du 14 mars. <i>Id.</i>	+ 1/1.280	+ 1/1.280	+ 1/1.280	+ 1/1.280
	Vol. 2.	0	± 1/40		+ 1/1.280	± 1/1.280		
Vaccin alumine.	Vol. 1.	0	0	<i>Id.</i> <i>Id.</i>	0	0	+ 1/320	
	Vol. 2.	+ 1/80	+ 1/80 ± 1/160		+ 1/1.280	+ 1/1.280	+ 1/1.280	+ 1/1.280
Vaccin gras.	Vol. 1.	+ 1/40	0	<i>Id.</i> <i>Id.</i> <i>Id.</i> <i>Id.</i>	+ 1/1.280	+ 1/1.280	+ 1/1.280	+ 1/1.280
	Vol. 2.	0	+ 1/80		Morte accidentellement le 5 avril.			
	Vol. 3.	0	0		+ 1/1.280	± 1/1.280	+ 1/1.280	+ 1/1.280
	Vol. 4.	+ 1/80 ± 1/160	+ 1/40 ± 1/80		+ 1/80 ± 1/160	+ 1/1.328 ± 1/1.640	+ 1/1.280	+ 1/1.280

TABLEAU II. — Volailles du même lot que ci-dessus éprouvées par cohabitation quatre mois après la vaccination.

VACCINATIONS des 1 ^{er} et 16 février		TEST					TEST	
		du 16 février	du 14 mars	du 6 mai	du 6 juin		du 7 juillet	du 11 août
Vaccin carbone.	Vol. 1.	+ 1/40 ± 1/80	0	0	0	Epreuve du 18 juin.	+ 1/640	+ 1/1.280
	Vol. 2.							
Vaccin alumine.	Vol. 1.		+ 1/80	+ 1/40	+ 1/40	<i>Id.</i> <i>Id.</i>	0	
	Vol. 2.		0	0	0		+ 1/80	+ 1/1.280
Vaccin gras.	Vol. 1.		0	± 1/40	0	<i>Id.</i> <i>Id.</i> <i>Id.</i>	+ 1/40	+ 1/1.280
	Vol. 2.		+ 1/80	0	+ 1/40		+ 1/40	+ 1/1.280
	Vol. 3.		0	0	0		+ 1/1.280	+ 1/1.280

TABLEAU III. — Volailles éprouvées par cohabitation trois mois après la vaccination.

VACCINATIONS des 22 avril et 7 mai 1919		TEST du 19 août		TEST du 18 septembre
Vaccin alumine.	Vol. 1.	0	Epreuve du 26 août. <i>Id.</i> <i>Id.</i> <i>Id.</i> <i>Id.</i>	+ 1/160
	Vol. 2.	+ 1/40		+ 1/1.280
	Vol. 3.	0		+ 1/640 ± 1/1.280
	Vol. 4.	± 1/40		+ 1/640 ± 1/1.280
	Vol. 5.	+ 1/40		+ 1/1.280

TABLEAU IV. — Volailles éprouvées par cohabitation cinq mois et demi après la vaccination.

VACCINATIONS des 19 février et 10 mars 1949	NUMÉROS des sujets	TEST du 25 août		TEST du 18 septembre 1949
Vaccin carbone .	27	0	Epreuve du 26 août. <i>Id.</i>	+ 1/320 ± 1/640 + 1/640
	28	0		
Vaccin alumine .	25	0	<i>Id.</i> <i>Id.</i>	+ 1/640 ± 1/320 + 1/160
	26	0		
Vaccin gras . . .	33	0	<i>Id.</i> <i>Id.</i>	+ 1/1.280 + 1/1.280
	34	+ 1/40		

TABLEAU VI. — Volailles éprouvées par inoculation virulente (injection intra-musculaire) quatre mois après la vaccination.

VACCINATIONS des 19 février et 10 mars 1949	NUMÉROS des sujets	TEST			TEST	
		du 16 mai	du 13 juillet		du 26 juin	du 13 septembre
Vaccin carbone .	8	0	0	Epreuve du 13 juillet. <i>Id.</i>	± 1/640	> à 1/1.280
	10	0	0		± 1/640	> a 1/1.280
Vaccin alumine .	21	0	0	<i>Id.</i> <i>Id.</i>	+ 1/80	> 1/1.280
	22	0	0		± 1/40	> 1/1.280
Vaccin gras . . .	19		0	<i>Id.</i> <i>Id.</i>	+ 1/640	> 1/1.280
	20		0		+ 1/640	après 35 min. > 1/1.280 après 35 min.

TABLEAU VII. — Volailles du même lot que ci-dessus éprouvées par inoculation virulente (injection intra-musculaire) cinq mois et demi après la vaccination.

	NUMÉROS des sujets	TEST			TEST du 18 septembre
		du 16 mai	du 25 août		
Vaccin carbone .	29	0	0	Epreuve du 26 août. <i>Id.</i>	+ 1/1.280
	30	0	0		+ 1/1.280
Vaccin alumine .	23	0	0	<i>Id.</i> <i>Id.</i>	+ 1/320 ± 1/1.280
	24	0	0		+ 1/40
Vaccin gras . . .	31		+ 1/40	<i>Id.</i> <i>Id.</i>	+ 1/160
	32		0		+ 1/160

TABLEAU V. — Volailles éprouvées successivement par cohabitation puis par injection de virus.

VACCINATIONS des 19 février et 10 mars 19	NUMÉROS des sujets	TEST du 16 mai	Epreuve par cohabitation à la date du 4 juin.	TEST du 7 juillet	Epreuve du 13 juillet par inoculation de virus intramusculaire.	TEST du 26 juillet	TEST du 11 août	TEST du 13 septembre
Vaccin carbone.	7	0	<i>Id.</i>	+ 1/40	Epreuve du 13 juillet par inoculation de virus intramusculaire.		+ 1/640	+ 1/1.280
	11	0		+ 1/40 ± 1/80				
	12	0		+ 1/160 ± 1/320				
	16	0		0				
Vaccin alumine	17	0	<i>Id.</i>	+ 1/160	<i>Id.</i>	+ 1/40 ± 1/160	± 1/640	+ 1/1.280
	18	0	<i>Id.</i>	+ 1/80	<i>Id.</i>		+ 1/640	+ 1/1.280
	2	± 1/40	<i>Id.</i>	+ 1/160	<i>Id.</i>		+ 1/2.560	+ 1/2.560
Vaccin gras . . .	3	+ 1/40	<i>Id.</i>	+ 1/160	<i>Id.</i>		+ 1/2.560	+ 1/2.560
		± 1/80	<i>Id.</i>	+ 1/40	<i>Id.</i>		+ 1/2.560	+ 1/2.560
	4	0	<i>Id.</i>	+ 1/80	<i>Id.</i>		+ 1/2.560	+ 1/2.560

TABLEAU VIII. — Volailles éprouvées par inoculation virulente (voie intradermique).

VACCINATIONS des 22 avril et 7 mai	NUMÉROS des sujets	TEST du 18 août		TEST du 18 septembre
Vaccin Alumine	1	$\pm 1/40$	Epreuve du 26 août <i>Id.</i> <i>Id.</i> <i>Id.</i>	+ 1/1.280
	2	$\pm 1/80$		+ 1/1.280
	3	0		+ 1/640
	4	0		+ 1/1.280

La recherche du pouvoir inhibant du sérum de volailles ayant survécu à une atteinte grave de peste, puis réinfectées, a donné les résultats suivants :

STAT DU SUJET	TEST			TEST				
	du 17 février 1949	du 4 mars		du 23 mars	du 6 mai	du 6 juin	du 7 juillet	du 11 août 1949
ayant fait une peste en mars 1948 .	0	0	Transportées dès le 14 mars dans un parquet très contaminé, aucun signe clinique n'est apparu consécutivement à cette opération.		+ 1/40	+ 1/80	+ 1/320	+ 1/1.280
e, n° 130, malade en janvier 1949 . .	0	0		+ 1/640	+ 1/320	+ 1/640	$\pm 1/1.280$	+ 1/2 560
Atteintes de peste du 1 ^{er} au 10 février 1949 :								
oule 128	+ 1/40 $\pm 1/80$	$\pm 1/40$		+ 1/640	+ 1/80 $\pm 1/160$	+ 1/320	+ 1/320	$\pm 1/640$
oule 918		0		+ 1/640	+ 1/640	+ 1/640		+ 1/2.560
oule M15	+ 1/40	0		+ 1/640	+ 1/80	$\pm 1/160$	+ 1/640	+ 1/1.280
oule 925	$\pm 1/40$	+ 1/40		+ 1/640	+ 1/160	+ 1/160	$\pm 1/320$	+ 1/640

Ces expériences font ressortir les résultats suivants :

1° Dans le sérum de volailles vaccinées à l'aide de vaccins à base de virus adsorbé sur carbone ou sur alumine, ou de virus en excipient gras, il est difficile de faire la preuve de l'existence d'anticorps par la seule réaction de Hirst, quel que soit le temps écoulé entre la vaccination et l'époque de la récolte (quinze jours à cinq mois et demi).

2° La teneur en anticorps du sérum des sujets vaccinés dans les différents lots s'est toutefois avérée suffisante pour leur permettre de résister, sans réaction clinique apparente, à trois épreuves d'infectiosité, dont deux par inoculation de virus, toutes mortelles pour les témoins.

3° Après l'épreuve, le pouvoir inhibant du sérum apparaît rapidement et sa valeur s'accroît au cours des semaines suivantes pour se maintenir, parfois pendant plusieurs mois, à un taux élevé. Tout se passe comme si l'organisme était suffisamment protégé par les anticorps engendrés par la vaccination, malgré que leur teneur dans le sang soit inférieure au seuil de la réaction de Hirst ; sous les effets du virus d'épreuve, en l'absence de tout signe de maladie, la défense s'intensifierait par la création de nouveaux anticorps qui doteraient alors le sérum d'un pouvoir très inhibant vis-à-vis de la réaction d'hémo-agglutinabilité. L'on voit les avantages à tirer d'un procédé d'immunité basé sur une double vaccination par virus tué telle qu'elle est pratiquée ici, suivie, quinze ou vingt jours plus tard, d'une vaccination à l'aide de virus vivant, utilisé dans certaines conditions.

4° Comparativement, chez les volailles qui survivent à la peste après une atteinte sévère, le pouvoir inhibant du sérum est plus lent à se manifester, et sa valeur croît moins vite dans le temps.

5° L'immunité consécutive à une première atteinte de peste est encore suffisante après un an, à défaut de pouvoir inhibant du sérum vis-à-vis de la réaction de Hirst, pour permettre à l'animal en cause de subir sans danger une épreuve virulente qui tue le témoin dans les délais normaux.

En résumé, dans nos essais, la réaction de Hirst ne s'est pas révélée une méthode assez précise pour juger de l'immunité créée à la faveur de la vaccination. S'il est permis de considérer un test d'inhibition positif comme le signe d'une immunité acquise, aucune interprétation ne peut être donnée dans le cas où la réaction est négative. La condition est ici suffisante, mais non point nécessaire.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] LÉPINE (P.), SAUTIER (V.) et REINÉ (L.). Ces *Annales*, 1946, **72**, 523.
- [2] CORDIER (G.), CLAVIERAS (J.) et OUNAÏS (A.). Vaccination contre la maladie de Newcastle en Tunisie. Ces *Annales*, 1950, **78**, 302.

INFORMATION

Le D^r Fr. Gallia, chef du service des infections à virus de l'Institut national d'Hygiène, vient de disparaître à l'âge de trente-huit ans. Peu après sa promotion, en 1939, il s'était rendu au Vénézuéla avec d'autres médecins tchèques et fut attaché, jusqu'en 1946, à l'Institut Sérothérapique National de ce pays. Depuis son retour, il y a quatre ans, il s'était consacré à l'étude des virus pathogènes et plus particulièrement à l'encéphalite et à la poliomyélite, élargissant notablement les connaissances en ce domaine et individualisant une souche nouvelle. A trois reprises il s'était contaminé au cours de ses manipulations. Reprenant toujours trop vite, au mépris de sa santé, un travail qui le passionnait, il vient de succomber à la psittacose, ajoutant à la liste de ceux qui ont donné leur vie pour la science un nom bien connu et très apprécié des spécialistes français.

SOCIÉTÉ FRANÇAISE DE MICROBIOLOGIE

(Institut Pasteur, 25, rue du Docteur-Roux, Paris, 15^e.)

Séance du 2 Mars 1950.

Présidence de M. PRÉVOT

PRÉSENTATION D'OUVRAGE

M. Lépine : J'ai l'honneur de présenter, au nom de Sir Howard Florey qui en fait l'hommage à notre Société, le volumineux ouvrage *Antibiotics* (1) dû aux travaux d'une série de collaborateurs réunissant les noms de la célèbre équipe d'Oxford. C'est une étude d'ensemble de nos connaissances sur les antibiotiques. L'essor pris par les recherches sur les antibiotiques est tel qu'il n'a pas fallu moins de deux épais volumes aux auteurs pour traiter le sujet. L'ouvrage comporte 48 chapitres répartis en 11 parties successives correspondant respectivement, pour les deux premières, à l'historique de la question, aux méthodes générales expérimentales de détection, d'extraction, d'essais et de mesures d'activité antibiotique des substances et des germes essayés. La troisième partie comporte une revue générale des espèces mycéliennes qui ont fait l'objet de recherches antibiotiques. La quatrième partie est consacrée aux substances autres que la pénicilline extraites de *Fungi imperfecti*, des Ascomycètes, Basidiomycètes et Phycomycètes. La cinquième partie est consacrée aux antibiotiques autres que la streptomycine extraits des Actinomycètes. Sixième partie : antibiotiques d'origine bactérienne. Septième partie : antibiotiques extraits des lichens, des algues, etc.

Dans le deuxième volume, la huitième partie, qui comprend à elle seule 25 chapitres, expose la question complète de la pénicilline, depuis sa découverte et sa pharmacologie, jusqu'aux travaux les plus récents sur sa constitution chimique.

La neuvième partie groupe tous les chapitres consacrés à la streptomycine. La dixième partie étudie le mécanisme de l'action des antibiotiques sur les bactéries. Enfin, on trouvera, dans la onzième partie, les conclusions générales rédigées par Abraham et Florey.

En appendice, des tableaux importants groupent les données bota-

(1) H. W. FLOREY, E. CHAIN, N. G. HEATLEY, M. A. JENNINGS, A. G. SANDERS, E. P. ABRAHAM et M. E. FLOREY, *Antibiotics*, Geoffrey Cumberlege, Oxford University Press, Londres, 1949, 2 volumes, 1.774 pages, Livr. sterl. 8/8 net.

niques, chimiques et physiques, ainsi qu'un nombre de constantes étudiées à propos des antibiotiques. Ces tableaux occupent 65 pages. Enfin, la bibliographie occupe à elle seule 80 pages et précède de copieuses tables analytiques et de noms d'auteurs.

Dans l'ensemble, cet ouvrage unique en son genre réalise un traité complet des antibiotiques et a réussi à condenser la matière d'une bibliothèque entière. Techniquement, sa présentation et ses illustrations sont impeccables. La valeur de documentation qu'il apporte fait que tout auteur travaillant les antibiotiques devra s'y référer constamment.

LIVRE REÇU

Selective toxicity and antibiotics. Symposia of the Society for experimental Biology, Number III, 1949, University Press, Cambridge.

Dans ce livre des plus intéressants sont réunis les mémoires présentés à la « Society for Experimental Biology », à Edimbourg, en juillet 1949. Les chercheurs de disciplines très diverses y trouveront tant des sujets particuliers que des problèmes généraux traités par les auteurs les plus compétents. Chaque article est complété d'une importante bibliographie. Voici les sujets traités : Relations entre la constitution chimique et le comportement d'une molécule dans un organisme vivant (W. A. Sexton) ; Activité de certains médicaments antipaludiques sur les protozoaires et les bactéries (F. L. Rose) ; Action des poisons sur les tissus en fonction de leur activité sur les enzymes (R. L. Peters) ; Action des inhibiteurs bactériens sur les métabolites essentiels (H. N. Rydon) ; Antibiotiques produits par *B. polymyxa* (G. Brownlee) ; Activité antibiotique des résines du houblon (L. R. Bishop) ; Résistance aux insectes des plantes traitées par des composés fluorés ou phosphorés (H. Martin) ; Action de surface et perméabilité, facteurs de l'activité des médicaments (A. R. Trum et A. E. Alexander) ; Action insecticide et perméabilité de la cuticule chez les insectes (J. E. Webb) ; Sélectivité des médicaments dans les infections du sang à protozoaires (E. M. Lourie) ; Aspects de la toxicité sélective des sulfamides et autres inhibiteurs bactériens antimétabolites (D. D. Woods et R. N. Nimmo-Smith) ; Action toxique des acides gras à longue chaîne sur la croissance d'*Haemophilus pertussis* et autres germes (M. R. Pollock) ; Action des acides gras insaturés sur les bactéries Gram positives (E. Kodicek) ; Action de la pénicilline sur l'assimilation et l'utilisation des aminoacides par les germes Gram positifs (E. F. Gale) ; Résistance adaptative des bactéries aux substances inhibitrices (C. N. Hinshelwood) ; Rôle de la concentration des ions hydrogène dans l'étude des produits toxiques (E. W. Simon et G. E. Blackman) ; Action des phénylcarbamates sur la croissance des plantes supérieures (G. W. Iwens et G. E. Blackman) ; Toxicité comparée des substances phytocides (G. E. Blackman, K. Holly et H. A. Roberts) ; Interférences thérapeutiques : action préventive vis-à-vis des substances toxiques (A. Albert) ; Influence de la nutrition sur la production et l'inhibition des tumeurs (L. A. Elson) ;

Rôle des métabolites d'excrétion et en particulier des antibiotiques en Ecologie (C. E. Lucas) ; Production d'antibiotique et équilibre biologique dans le sol (P. W. Brian).

A. LAMENSANS.

COMMUNICATIONS

ADAPTATION DE LA MÉTHODE DES TUBES ROULANTS A LA TECHNIQUE DE CULTURE DE TISSUS SUR MEMBRANES PLASTIQUES

par GEORGES BARSKI.

L'idée de cultiver des tissus sur la paroi intérieure d'un tube rempli partiellement de milieu nutritif et soumis à un mouvement de rotation très lent résout certainement d'une manière simple et élégante la question du renouvellement du milieu de culture.

Par comparaison avec d'autres techniques, qui tendent à assurer aux tissus cultivés une circulation constante d'excès de milieu nutritif par des dispositifs mécaniques plus ou moins compliqués [8], la méthode des tubes roulants, réalisée par Gey en 1933 [5], possède des avantages évidents. Remarquons ici que l'idée de cette solution avait été émise en 1913 par Carrel [3] et reprise en 1925 par Löwenstädt [9].

La méthode des tubes roulants, telle qu'elle a été décrite par Gey et pratiquée ensuite par de nombreux auteurs, présente pourtant certains inconvénients.

Les cultures développées sur la paroi incurvée et épaisse du tube sont difficiles à observer, surtout au fort grossissement du microscope. Elles ne peuvent pas non plus fournir des préparations fixées et colorées en vue d'un examen histologique détaillé.

Pour remédier à ce défaut, Gey [5] propose des tubes hexagonaux à parois parallèles. Shaw, Kingsland et Brues [10], à leur tour, recommandent le remplacement des tubes par des flacons aplatis dont une paroi est fermée par une lamelle amovible.

Un autre inconvénient, plus général d'ailleurs, est lié à la présence du plasma comme support des tissus en croissance. Nous avons exposé dans nos publications antérieures [4, 13] la nature de cet inconvénient. Les récents travaux de Hanks [7] et de White et Lasfargues [12] viennent d'y apporter de nouveaux arguments.

Bien que quelques auteurs affirment que la croissance puisse se faire directement sur verre, ils reconnaissent néanmoins que, dans ces conditions, elle est possible uniquement pour certains tissus [6]. En outre, elle est, sur le verre, toujours moins régulière et moins abondante [12].

Depuis trois ans, nous pratiquons la culture de tissus sur un support artificiel constitué par une membrane polyvinylique très mince étalée (non collée) à la surface du verre. Après avoir réalisé et observé des

milliers de cultures de tissu mésenchymateux, épithélial et surtout nerveux [1, 2], il est pour nous hors de doute que l'interposition d'une telle membrane entre le verre et le tissu favorise grandement la croissance de ce dernier.

Sur les membranes plastiques, elle est au moins aussi rapide et abondante que sur plasma, à condition d'assurer aux tissus un milieu nutritif convenable.

Nos observations concernant l'avantage de l'emploi d'un support organique chimiquement inerte ont été confirmées récemment par J. Evans et W. R. Earle [4] qui utilisent à cette fin des feuilles de cellophane perforées.

Le succès obtenu dans l'emploi de membranes plastiques pour les

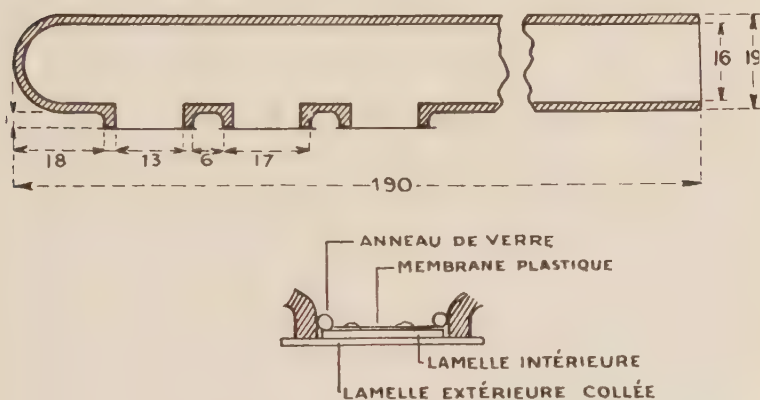


FIG. 1. — Dessin schématique du tube démontable spécial et d'une alvéole de ce tube avec la culture.

cultures tissulaires « immobiles » nous a incité à appliquer celles-ci à un système de culture en rotation continue. Nous donnons ici la description de ce dispositif et des premiers résultats obtenus.

La culture se fait dans des tubes spéciaux en pyrex, de 190 mm. de longueur et de 19 mm. de diamètre extérieur, comportant chacun trois ouvertures rondes faisant saillie latéralement. Ces proéminences ont des bords rodés et sont disposées le long d'une génératrice du tube, formant ainsi des alvéoles (fig. 1). Contre les ouvertures latérales, nous fixons, avec un mélange de paraffine et de vaseline ou avec une résine synthétique, des lamelles couvre-objet rondes de 19 mm. de diamètre. La culture elle-même s'effectue sur des lamelles de 12 mm. de diamètre recouvertes d'une membrane plastique (voir nos publications antérieures [1, 2, 3]). Ces lamelles sont introduites avec une pince spéciale à l'intérieur de chacune de trois alvéoles.

La mise en culture peut être effectuée de deux manières.

1° La lamelle ayant les explants à sa surface est introduite d'emblée dans le tube et fixée à l'aide d'un anneau de verre de 13 mm. de diamètre qui l'appuie contre le fond formé par la lamelle collée. On

introduit ensuite dans chaque alvéole, avec une pipette Pasteur suffisamment longue, X gouttes environ de milieu nutritif. Si on veut s'assurer de la bonne fixation des fragments tissulaires contre la membrane plastique, il est préférable d'introduire le milieu de culture au-dessous de la membrane d'où il diffuse peu à peu. Après avoir bouché hermétiquement le tube, on laisse la culture à l'étuve à 37° C pendant au moins vingt-quatre heures. L'étuve doit être de type couveruse avec un élément chauffant au-dessus pour éviter la dessiccation des cultures. Après vingt-quatre heures ou, pour des tissus de croissance plus lente, au bout de deux à trois jours, on introduit dans les tubes 3 cm³ de milieu nutritif et on les place dans l'appareil rotatif.

2° La culture peut être également commencée dans les conditions habituelles sur des lames de verre en boîtes de Petri [43, 4], avec la seule différence que nous interposons entre la membrane plastique et la lame de verre la lamelle ronde de 12 mm. qui sera introduite plus tard dans le tube spécial servant pour la culture en rotation.

La deuxième manière de procéder nous semble préférable. Elle nous permet de faire le triage parmi les cultures incubées en série en boîtes de Petri et de choisir celles que nous destinons à la culture prolongée en tubes roulants.

Le milieu liquide que nous avons employé pour la culture du tissu embryonnaire de poule est composé de deux parties de liquide de Tyrode, d'une partie de sérum de poule et d'une partie d'extrait embryonnaire de poulet. Ce milieu est renouvelé tous les quatre à cinq jours.

L'appareil rotatif comprend un tube tournant monté sur un axe fixe par l'intermédiaire de deux roulements à billes. Sur le tube sont fixés trois disques en duralumin de 30 cm. de diamètre (voir fig. 2).

Le disque antérieur et le suivant sont percés de trous de 20 mm. de diamètre disposés en trois couronnes, en tout 48 trous. Sur le premier disque, les trous sont agrandis de 8 mm. en direction du centre, ce qui permet de faire passer les proéminences de nos tubes de culture.

Cet ensemble tournant est monté sur un simple support en duralumin. Deux vis donnent à l'axe une inclinaison de 6° sur l'horizontale.

Les disques sont mis en mouvement à l'aide d'un moteur synchrone de pendule électrique. L'axe du système tourne à la vitesse de 4 tours par heure (1). L'appareil est placé dans une étuve ordinaire à 37° C.

Dès les premières observations, nous avons pu constater que nos cultures trouvent dans ces tubes roulants de nouveau modèle de très bonnes conditions de croissance. La migration cellulaire et l'envahissement par le tissu en croissance de toute la surface de l'alvéole sont nettement plus rapides que dans nos cultures témoins immobiles. La croissance de l'épithélium est particulièrement bonne; au bout de quarante-huit heures, il forme des nappes en couche unicellulaire atteignant 4-5 mm. de diamètre.

L'observation des détails histologiques à l'état vivant et au fort grossissement est facilitée par la minceur des deux lamelles qui séparent la culture de l'objectif. La fixation et la coloration de ces cultures

(1) La transmission s'effectue par l'intermédiaire d'un embrayage à friction qui permet de tourner l'ensemble des disques pour les mettre dans la position désirée indépendamment de la rotation du moteur.

sont effectuées à l'intérieur du tube. Si les lamelles extérieures sont fixées à l'aide de résine synthétique, nous plongeons verticalement le tube au stade final de déshydratation dans un récipient contenant de l'acétone qui ramollit la résine et permet de décoller les lamelles supportant les cultures colorées et de les monter sur lame comme des coupes histologiques ordinaires.

Ce système de culture se prête spécialement bien aux études concer-

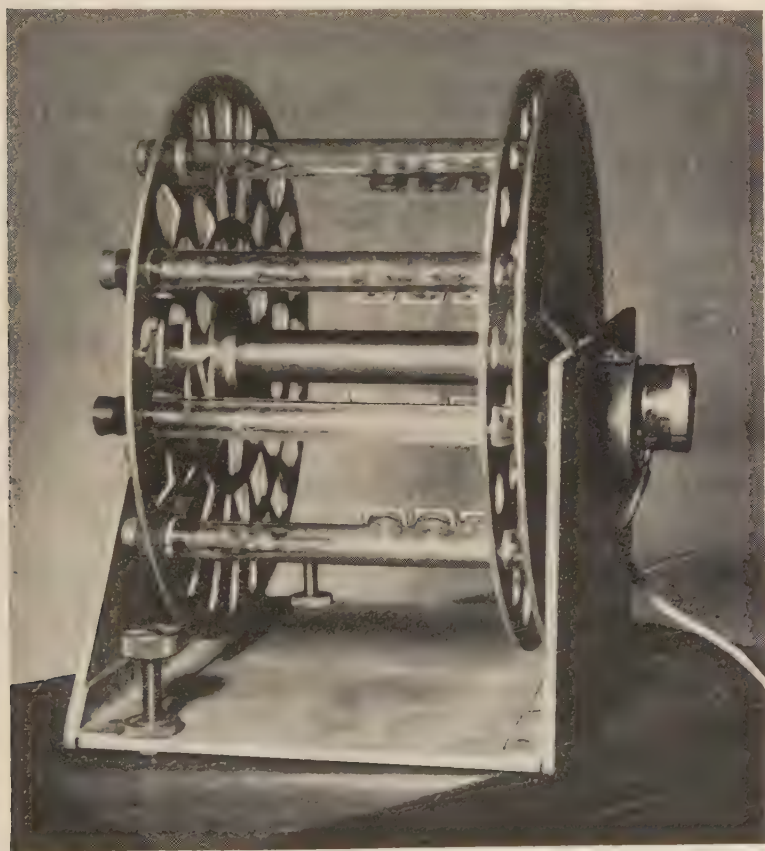


FIG. 2. — Appareil rotatif avec les tubes.

nant l'influence de facteurs chimiques sur les tissus et les cellules et en particulier à l'étude analytique des facteurs de croissance. Le fait que le tissu n'est entouré d'aucune gaine protectrice, constituée habituellement par le plasma coagulé, et que l'échange de substances entre la cellule et l'extérieur est grandement favorisé par la circulation constante de ce milieu, doit faciliter la mise en évidence de l'action des substances étudiées sur le tissu.

RÉSUMÉ. — Les tubes ordinaires dans le système de culture de tissus « en rotation » sont remplacés par un modèle spécial comportant trois ouvertures rodées, contre lesquelles on applique des lamelles amovibles. Les cultures se font sans plasma sur des lamelles recouvertes de membranes plastiques. Ce dispositif facilite l'observation à l'état vivant et permet d'obtenir rapidement des préparations colorées.

(Institut Pasteur, Service des Virus [D^r P. LÉPINE].)

BIBLIOGRAPHIE

- 1] BARSKI (G.) et MAURIN (J.). *Ces Annales*, 1948, **74**, 312.
- 2] BARSKI (G.), MAURIN (J.) et CROISSANT (M^{lle} O.). *Ces Annales*, 1949, **76**, 1.
- 3] CARREL (A.). *Berl. klin. Wochenschr.*, 1913, **50**, 1097.
- 4] EVANS (J.) et EARLE (W. R.). *J. Nat. Cancer Inst.*, 1947, **8**, 103.
- 5] GEY (G. O.). *Am. J. Cancer*, 1933, **47**, 752.
- 6] GEY (G. O.) et GEY (M. K.). *Am. J. Cancer*, 1936, **27**, 45.
- 7] HANKS (J. H.). *Proceed. Soc. exp. Biol. Med.*, 1949, **71**, 313.
- 8] LINDBERGH (C.). *J. exp. Med.*, 1939, **70**, 231.
- 9] LÖWENSTADT (H.). *Arch. exp. Zellforsch.*, 1925, **4**, 251.
- 10] SHAW (D. T.), KINGSLAND (L. C.) et BRUES (A. M.). *Science*, 1940, **91**, 149.
- 11] WHITE (P. R.). *Growth*, 1946, **10**, 231.
- 12] WHITE (P. R.) et LASFARGUES (E.). *Proceed. Soc. exp. Biol. Med.*, 1949, **71**, 479.
- 13] WIRTH (J.) et BARSKI (G.). *Ces Annales*, 1947, **73**, 987.

RECHERCHES SUR LA PHYSIOLOGIE DES *AZOTOBACTER* EN ASSOCIATION AVEC CERTAINS GERMES OLIGONITROPHILES DU SOL

par J. KAUFFMANN.

Lors de l'isolement des fixateurs d'azote atmosphérique par la technique des grains de terre sur plaque de silico-gel (1), on remarque très souvent la présence de germes oligonitrophiles au sein des colonies d'*Azotobacter*. Nous nous sommes demandé s'il ne s'agirait pas d'une association naturelle amenant des modifications dans les fonctions physiologiques des *Azotobacter*. Les études ont porté sur la croissance, la production de substance noire et le rendement de fixation.

Les cultures sont faites sur milieu de Winogradsky (2) glucosé à 1 p. 100, en tubes Legroux à raison de 25 cm³ de milieu par tube. Chacune des 11 souches d'oligonitrophiles que nous possédons est cultivée avec des *Azotobacter*. Des cultures séparées d'oligonitrophiles et d'*Azotobacter* servent de témoins.

Le même plan d'expérience est réalisé sur un milieu où le glucose est remplacé par du benzoate de soude à 1 p. 100.

(1) WINOGRADSKY, *Ces Annales*, 1925, **39**, 299.

(2) WINOGRADSKY, *Ces Annales*, 1926, **40**, 480.

Les fioles sont placées dans une conserve cylindrique de dimension adéquate, à tubulure basale et recouverte d'une plaque de verre. On fait arriver par la tubulure un courant d'air sous pression débarrassé de NH_3 par un barbotage dans SO_4H_2 et humidifié par un second barbotage dans l'eau. On a eu soin de mettre un peu d'eau au fond de la conserve. Le tout est placé à l'étuve à 37° . L'évaporation des milieux de culture est ainsi annulée (après un mois à l'étuve, le volume du milieu de culture d'une fiole témoin correspond au volume initial).

Croissance. — La croissance des germes est mesurée quotidiennement au photomètre de Meunier. On constate alors qu'il n'y a pratiquement

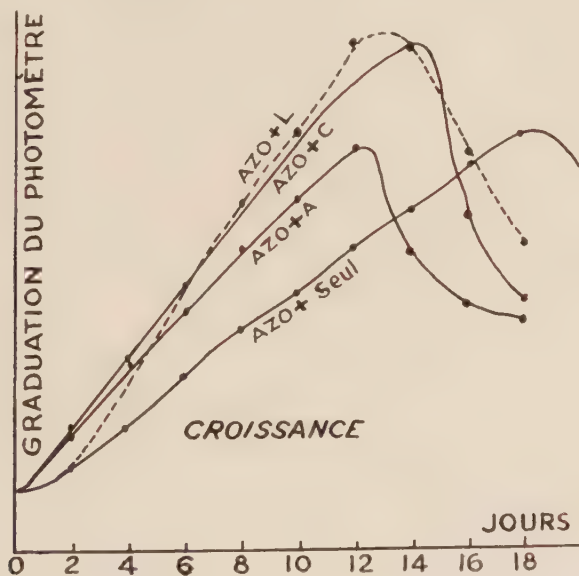


FIG. 1.

aucune croissance dans les tubes où les oligonitrophiles ont été ensemencés seuls et, corrélativement, qu'il n'y a pas eu d'azote fixé (dosage par la méthode de Kjeldahl).

Pour les cultures mixtes, les croissances sont représentées dans la figure 1 où seulement les courbes de trois associations type ont été tracées (souches A, C et L en présence d'*Azotobacter* (3), les autres germes oligonitrophiles se comportant de la même façon, c'est-à-dire par une activation de la synthèse de substance microbienne par rapport à l'*Azotobacter* ensemencé seul.

Dès le troisième jour de culture, l'examen microscopique révèle une prolifération des oligonitrophiles représentant environ le 1/3 des *Azotobacter*. Ce pourcentage diminue progressivement et, en fin de culture, les oligonitrophiles ont presque complètement disparu.

(3) J. KAUFFMANN, J. POCHON et Y. T. TCHAN, *Ces Annales*, 1948, **75**, 83.

Elaboration de substance noire. — Pour étudier l'influence de cette association sur la production de substance noire à partir du benzoate de sodium (4) comme aliment carboné, on opère de la façon suivante : on prélève chaque jour 1 cm³ de culture que l'on complète à 10 cm³ avec de l'eau distillée. On ajoute 11 gouttes de soude à 10 p. 100 de façon que le milieu soit franchement alcalin, ce qui solubilise le corps noir. On centrifuge dix minutes à 4.600 tours. On mesure l'intensité d'absorption de la solution surnageante à l'aide du photomètre de Meunier

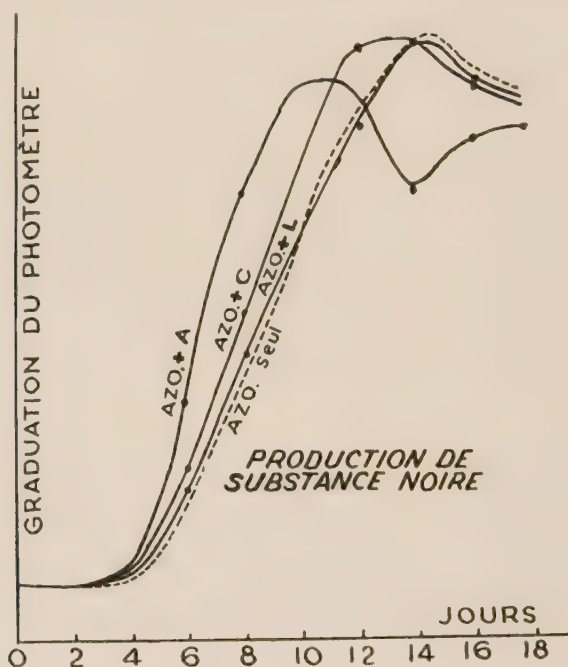


FIG. 2.

écran bleu). Les résultats obtenus sont représentés dans la figure 2. Ici encore, pour la clarté du graphique, les trois associations ont été représentées. On constate, sauf pour les souches K et L, une activation de la production de substance noire. L'étude microscopique des milieux au benzoate montre le même phénomène que dans le milieu au glucose : au début de la culture, les oligonitrophiles représentent environ la moitié des germes pour disparaître en fin de culture.

Sur les 11 souches d'oligonitrophiles, seules les souches C, E et F sont capables, ensemencées isolément, de produire le corps noir à partir du benzoate dans un milieu azoté. L'étude comparative montre que la souche F, la plus active des trois à ce point de vue, l'est encore beau-

(4) Y. T. TCHAN, Ces Annales, 1946, 72, 699.

coup moins que les *Azotobacter*. Ceci n'explique d'ailleurs nullement le phénomène d'activation de production de substance noire produit par l'association oligo + *Azotobacter*. Ce phénomène se produit en effet avec la plupart des souches d'oligonitrophiles, même celles qui, seules, ne forment pas de corps noirs.

Rendement de fixation. — L'association oligonotrophile + *Azotobacter* exerce également une influence sur le rendement de fixation, comme le prouve l'expérience suivante :

Le milieu de culture glucosé à 1 p. 100 est réparti dans des fioles d'Erlenmeyer à raison de 100 cm³ de milieu par fiole. Celles-ci sont placées dans la conserve cylindrique et soumises aux mêmes conditions que les tubes Legroux cités plus haut. Après vingt jours de culture à l'étuve à 37°, on dose l'azote fixé par la méthode de Kjeldahl et le glucose utilisé par la méthode de G. Bertrand. Les défécations sont faites à l'acide phospho-tungstique à 13 p. 100, suivies d'une centrifugation et d'une filtration. Les résultats sont résumés dans le tableau suivant :

SOUCHES utilisées	AZOTE FIXÉ en milligrammes dans 10 cm ³ de milieu	GLUCOSE utilisé en milligramme dans 10 cm ³ de milieu	RENDEMENT de fixation rapporté à 100 mg. de glucose	POURCENTAGE d'augmentation ou de diminution
<i>Azotobacter</i> . . .	0,308	33,25	0,924	0
<i>Azoto</i> + A	0,364	56,6	0,644	— 30,3
<i>Azoto</i> + B	0,266	29,5	0,901	— 2,1
<i>Azoto</i> + C	0,252	22	1,184	+ 28,2
<i>Azoto</i> + E	0,341	25	1,366	+ 47,8
<i>Azoto</i> + F	0,294	21,25	1,383	+ 49,6
<i>Azoto</i> + G	0,322	30,25	1,064	+ 15,1
<i>Azoto</i> + H	0,392	25	1,568	+ 69,6
<i>Azoto</i> + I	0,616	100	0,616	— 33,3
<i>Azoto</i> + J	0,420	28	1,498	— 62
<i>Azoto</i> + K	1,168	25	0,612	— 27,2
<i>Azoto</i> + L	0,336	38,5	0,870	— 5,8

On voit ainsi que certains germes oligonitrophiles augmentent le rendement de fixation. D'autres, au contraire, le diminuent.

L'étude comparative des courbes et des rendements de fixation montre qu'il n'y a aucun parallélisme entre variation de croissance, variation de production de substance noire et quantité d'azote fixée par gramme de glucose. Le rendement est d'ailleurs indépendant du nombre des *Azotobacter*.

L'association *Azotobacter*+souche L, par exemple, présente un maximum de croissance au quatorzième jour de culture, supérieur au maximum de l'association *Azotobacter* + souche H qui a lieu au même moment. L'examen microscopique montre dans les deux cas le même pourcentage d'oligonitrophiles qui est égal environ au 1/10 des *Azotobacter*. Or, comme l'indique le tableau, les rendements de fixation sont très différents dans les deux cas. De même, la quantité d'azote fixé est plus grande dans l'association *Azotobacter*+H que dans l'association *Azotobacter*+L.

Que peut-on conclure de ces résultats ?

Il semble qu'une substance produite par certains germes oligonitrophiles active certaines fonctions physiologiques des *Azotobacter*. Les rendements de fixation ne sont pas fonction des seuls fixateurs. Telle terre pauvre ou riche en *Azotobacter* possédera ou non un bon rendement de fixation, suivant que la résultante de tous les phénomènes d'association microbienne au sein du sol sera ou non en faveur d'une amélioration du rendement de fixation des germes fixateurs d'azote atmosphérique.

(Institut Pasteur, Service de Microbie technique et O.R.S.O.M.,
Laboratoire de Biologie des Sols.)

ESSAI D'ABAISSMENT *IN VITRO* DE LA RÉSISTANCE DE CERTAINS STAPHYLOCOQUES AUX ANTIBIOTIQUES

par R. FASQUELLE et P. BARBIER.

Pour expliquer l'augmentation de la résistance des germes aux antibiotiques, il est classique d'opposer les deux thèses, celle de la mutation spontanée suivie de sélection et celle de l'adaptation.

Le mécanisme invoqué pour la première est extrêmement simple : spontanément, au hasard, un certain nombre de germes présenteraient une mutation ; l'antibiotique ensuite opérerait une sélection des mutants résistants, en faisant disparaître les germes restés sensibles.

La seconde théorie, par contre, celle de l'adaptation, mérite d'être analysée. Il est d'abord facile de montrer qu'elle se ramène à la notion d'une mutation induite : si le mot adaptation convient, en effet, à l'égard des modifications de résistance aux antibiotiques de la lignée bactérienne entière, le mot mutation induite s'applique au contraire au germe à partir duquel le caractère héréditaire de sensibilité à l'antibiotique a été muté en caractère résistant.

Mais la conception même de cette mutation induite doit être discutée : les auteurs, en effet, sont d'accord pour affirmer que tous les germes exposés à l'antibiotique ne subissent pas cette mutation induite. C'est donc reconnaître d'une part que les germes qui ne l'auront pas subie, restés sensibles, seront éliminés par l'antibiotique ; c'est reconnaître d'autre part, qu'avant que l'induction ne s'exerce, les germes, identiques au départ comme composants d'un même clone, ne le sont plus : certains, en effet, se montrent aptes à subir l'induction, tandis que les autres y sont réfractaires. En bref, c'est constater que sous l'expression « mutation induite » se cachent un mécanisme de sélection par l'antibiotique et un mécanisme de mutation (ou de variation) précédant l'action de l'antibiotique.

Dès lors, une des trois attitudes suivantes peut être adoptée :

Ou l'on supposera à la fois que le germe subit deux mutations (ou variations) l'une primitive et spontanée, l'autre induite par l'antibio-

tique, et que l'antibiotique agit d'abord comme inducteur, puis comme sélecteur, ce qui paraît fort complexe et bien mystérieux ;

Ou l'on se contentera d'invoquer une mutation spontanée du germe, suivie d'une sélection par l'antibiotique, ce qui revient à renoncer à la thèse de la mutation induite ;

Ou encore on ne reconnaîtra à l'antibiotique qu'un rôle de sélection, tout en maintenant que la mutation du germe, précédant l'action de l'antibiotique, n'est pas spontanée ; autrement dit, on admettra que quelque chose d'autre que l'antibiotique induit une mutation (ou une variation) du germe.

Lorsque la question est ainsi posée de rechercher quelle peut être, en dehors de l'antibiotique, la cause d'une mutation (ou d'une variation) du germe, on est amené immédiatement à penser au *milieu* dans lequel il se développe.

De même qu'en cultivant un microbe dans des milieux pauvres ou au contraire complexes, on assiste à des dégradations ou à des enrichissements morphologiques, antigéniques ou enzymatiques des germes, de même on conçoit que la modification du milieu déterminée par la culture du germe en présence de l'antibiotique, puisse provoquer un changement dans le germe ; or ce milieu où coexistent germe et antibiotique est enrichi de tous les métabolites complexes résultant de la lyse des germes qui succombent. Il paraît donc vraisemblable d'attribuer à ces métabolites complexes mis en liberté par la lyse microbienne le rôle inducteur déterminant l'apparition des mutants (ou des variants) résistants.

Une telle hypothèse n'est pas en contradiction avec les faits connus d'augmentation *in vitro* de la résistance aux antibiotiques : c'est dans le tube où l'antibiotique est à la concentration critique qu'apparaissent les mutants résistants : or, c'est précisément dans ce tube que sont en contact forcé les quelques germes qui ont échappé à l'action de l'antibiotique et les métabolites complexes résultant de la lyse des autres.

L'apparition des mutants résistants n'est pas immédiate, mais est d'autant plus nette, que le contact est plus prolongé entre les germes contenus dans l'inoculat et l'antibiotique : or, plus ce temps est long et plus de germes entrent en lyse.

La résistance apparaît souvent d'autant plus élevée que l'inoculat est plus large, c'est-à-dire que le nombre des germes lysés est plus grand.

Cette même hypothèse est conforme aux constatations cliniques : les germes résistants sont en règle isolés chez des sujets qui ont reçu de manière prolongée un antibiotique à dose insuffisante ; or un tel traitement est justement celui qui a pour effet de maintenir au contact, dans l'organisme, pendant de longs jours, quelques germes non atteints par l'antibiotique et les métabolites complexes continuellement mis en liberté par la lyse des autres.

Si donc cette hypothèse paraît défendable, que l'acquisition de la résistance serait due à la mise à la disposition du germe de métabolites complexes préfabriqués (résultat de la bactériolyse des germes homologues), il paraîtra logique de penser qu'un abaissement de la résistance devrait résulter de la mise à la disposition du germe, au cours de passages successifs, de métabolites au contraire très simples.

C'est ce dernier point que nous avons essayé de vérifier en tentant de cultiver en milieux synthétiques une série de staphylocoques pathogènes résistants.

Nous y avons réussi pour 2 staphylocoques dorés, isolés récemment de l'organisme : le staphylocoque C, qui, dans une famille avait été responsable successivement de lésions cutanées chez le père, d'abcès du sein chez la mère et d'une staphylococcie à rechutes chez le nourrisson, et dont la pénicilline à très fortes doses a, en définitive, triomphé chez les 3 sujets, et le staphylocoque S, isolé par hémoculture d'une septicémie à staphylocoques finalement mortelle, malgré un traitement à la streptomycine.

Le staphylocoque C, par titrage de la résistance selon la méthode des dilutions de Sureau et Chabbert, résistait à la dose de 50 unités par centimètre cube de pénicilline.

Le staphylocoque S, selon la même technique, résistait à la dose de 25 γ par centimètre cube de streptomycine.

Ces staphylocoques, nous les avons cultivés, au cours de passages successifs en milieu synthétique de Gladstone.

Au huitième passage, nous avons à nouveau, et selon la même technique, dosé leur résistance (après avoir naturellement fait subir aux germes une culture en bouillon de vingt-quatre heures).

La résistance du staphylocoque C à l'égard de la pénicilline avait diminué du 1/4, c'est-à-dire qu'il ne résistait plus qu'à 12 unités de pénicilline par centimètre cube.

La résistance du staphylocoque S, à l'égard de la streptomycine, avait diminué d'environ dix fois, c'est-à-dire qu'il ne résistait plus qu'à 3 γ par centimètre cube de streptomycine.

Cette faible diminution de la résistance est certes insuffisante pour emporter la conviction et il faudra attendre un beaucoup plus grand nombre de passages avant de pouvoir formuler une opinion valable. Cette constatation nous paraît néanmoins intéressante, car il est bien évident que pour abaisser aussi rapidement la résistance qu'on la fait monter *in vitro*, il faudrait disposer d'un sélecteur inverse de l'antibiotique qui supprimerait tous les germes résistants pour ne laisser vivre que les plus sensibles : or, ce sélecteur est difficilement concevable.

Dans cet ordre d'idées, nous tenons néanmoins à signaler un fait que nous avons constaté au cours de ces expériences et qui nous paraît curieux : comme nous ne disposions pas, au début de celles-ci, de milieu synthétique et que nous étions à la recherche d'un milieu très pauvre, nous avons ensemencé nos deux staphylocoques dans de l'eau salée à 8 p. 1.000 (II gouttes de bouillon de vingt-quatre heures pour 10 cm³ d'eau physiologique), et nous avons placé les tubes ainsi ensemencés à l'étuve à 37°. Or au bout de vingt-quatre heures, on constate un trouble opalescent manifeste ; la numération en boîte de Petri des germes contenus en eau salée avant et après le séjour à l'étuve révèle à l'évidence qu'il y a eu culture ; l'examen sur lame montre des grains staphylococciques plus petits et moins bien colorés par le bleu et le Gram, que lorsque la culture est faite en bouillon. Ajoutons que la culture en eau salée, si elle est repiquable en bouillon, ne l'est pas en second passage en eau salée.

Après culture donc en eau salée pendant vingt-quatre heures, nous

repiquons nos germes en bouillon, et à partir de la culture de vingt-quatre heures en bouillon, nous dosons à nouveau la résistance des deux germes à l'égard respectivement de la pénicilline et de la streptomycine :

Dans les premières heures du titrage, on constate que les staphylocoques, qui ont subi un passage en eau salée, ont une résistance très diminuée comparativement à celle de leurs souches d'origine ;

Au bout de vingt-quatre heures, la résistance est encore beaucoup moins grande pour le germe ayant subi le passage en eau salée que pour la souche (Staph. C : 3 unités au lieu de 50 ; Staph. S : 1,5 au lieu de 25 γ).

Mais, si l'on maintient les tubes à l'étuve quarante-huit, soixante-douze ou quatre-vingt-seize heures, on note que la résistance des germes ayant subi le passage en eau salée regagne celle de la souche, pour enfin la dépasser.

Tout se déroule en somme comme si un seul passage de vingt-quatre heures en eau salée avait fait perdre à nos staphylocoques une grande partie de leur résistance, mais en même temps leur avait conféré une telle malléabilité qu'ils étaient devenus aptes à réacquérir une résistance plus forte même que celle dont ils étaient doués au départ.

En conclusion, nous ne prétendons nullement que les expériences précédentes permettent d'apporter dans l'interprétation de la résistance des germes aux antibiotiques des arguments en faveur de la thèse de l'adaptation et de la mutation induite, et opposables valablement à la thèse de la mutation spontanée et de la sélection.

Nous avons seulement voulu montrer que dans ce problème, souvent obscurci par des considérations philosophiques ou génétiques *a priori*, un rôle essentiel est vraisemblablement joué par les métabolites mis à la disposition des germes : à côté des mutations spontanées ou de l'aptitude des microbes à sécréter de la pénicillinase, à côté de l'induction exercée directement sur eux par les antibiotiques, une place prépondérante, à notre avis, doit être accordée au milieu nutritif où tout se passe, et à son enrichissement par la bactériolyse.

(Laboratoire de Bactériologie de la Faculté de Médecine
[Professeur GASTINEL].)

ACTION DE LA STREPTOMYCINE ET DU PARA-AMINO-SALICYLATE DE SOUDE (P.A.S.) DANS LA TUBERCULOSE EXPÉRIMENTALE DU COBAYE

par R. MARAL et A. BLANDIN.

Nous avons étudié, chez le cobaye tuberculeux, l'action de la streptomycine associée au P. A. S.

Nous avons recherché en particulier quelle était l'action de cette association sur le devenir de la streptomycino-résistance des germes.

MÉTHODE. — Deux lots d'animaux, de poids moyen, 250-300 g. (24 cobayes par lot, au total 48 cobayes) sont infectés, l'un avec une souche de bacilles de Koch streptomycino-résistants (souche Fo), l'autre avec une souche de bacilles de Koch streptomycino-sensibles (souche H 37 RV).

Voici les chiffres de sensibilité *in vitro* des germes inoculés (titrage par dilutions successives en milieu de Dubos) :

H 37 RV : streptomycine 0.54 γ /cm³ et P. A. S. : 216 γ /cm³.

Souche Fo : streptomycine 540 γ /cm³ et P. A. S. : 352 γ /cm³.

1° *Inoculation*. — Elle est pratiquée par voie sous-cutanée, au niveau de la région inguinale droite (0,1 mg. de bacilles).

2° *Conduite des traitements*. — Chaque lot est divisé en 4 groupes qui seront traités d'une façon continue, soit avec la streptomycine, soit avec le P. A. S., soit avec l'association streptomycine + P. A. S. Un groupe ne reçoit rien et sert de témoin.

a) *Traitement à la streptomycine*. — Injection intramusculaire de 0,005 g. matin et soir. Dose journalière, 0,010 g. Début du traitement au seizième jour d'infection. Cobayes sacrifiés au vingt-neuvième jour de traitement. Durée totale de l'expérimentation : quarante-cinq jours.

b) *Traitement au P. A. S.* — Sel sodique de P. A. S., 0,10 g. sous un volume de 1 cm³. Début du traitement au seizième jour d'infection. Pendant huit jours, *injection intramusculaire* de 0,10 g. matin et soir, dose journalière, 0,20 g. La voie intramusculaire doit être abandonnée, en raison de l'apparition de foyers de nécrose aux points d'injections de la solution hypertonique.

Pendant trente-quatre jours : P. A. S. *per os*, 0,10 g. matin et soir ; dose journalière, 0,20 g.

Cobayes sacrifiés au quarante-deuxième jour de traitement. Durée totale de l'expérimentation : cinquante-huit jours.

c) *Traitement associé streptomycine + P. A. S.* — Début du traitement au seizième jour de l'infection. Traitement à la streptomycine, comme ci-dessus (a) ; traitement au P. A. S., comme ci-dessus (b). Cobayes sacrifiés au quarante-deuxième jour de traitement. Durée de l'expérimentation : cinquante-huit jours.

3° *Lecture des résultats*. — On note la présence du chancre d'inoculation, des ganglions. Le degré d'infection est apprécié suivant l'aspect de la rate, du foie et des poumons.

Suivant l'étendue des lésions spléniques, hépatiques et pulmonaires, l'abondance des foyers caséeux, nécrotiques, un coefficient (maximum 4) est attribué à chaque organe. Le total (maximum 12) indique l'indice de tuberculisation pour chaque animal.

La somme des indices des animaux d'un groupe, divisée par le nombre d'animaux du groupe indique l'indice moyen de tuberculisation du groupe.

Il s'agit évidemment là de chiffres très conventionnels ; mais ce moyen d'expression « quantitatif » nous a paru bien supérieur à une appréciation qualitative pour chaque groupe.

Il ne faut pas, cependant, donner aux chiffres une valeur trop absolue. D'abord à cause du facteur d'appréciation individuel, ensuite parce que chaque animal réagit suivant un mode qui lui est propre, enfin les groupes d'animaux sont constitués par un nombre d'individus qui paraîtra faible ; mais les chiffres enregistrés sont assez homogènes pour chaque groupe, ce qui permet de tirer de leur examen des conclusions valables.

RÉSULTATS OBTENUS. — Pour ne pas allonger le texte, nous ne donnerons pas le détail des chiffres pour chaque animal, mais voici les indices moyens de tuberculisation pour chaque groupe :

GROUPE D'ANIMAUX	INDICE MOYEN de tuberculisation du groupe	
	Souche Fo	Souche H37 RV
Groupe témoin	6	3
Groupe streptomycine	6,5	0,2
Groupe P. A. S.	2,7	2,6
Groupe streptomycine + P. A. S.	2,1	0,4

COMMENTAIRES. — Surtout si les écarts sont notables, nous pouvons tirer quelques conclusions valables de l'examen comparatif de ces chiffres :

1° La streptomycine a une action très nette dans le traitement de la tuberculose du cobaye due à une souche sensible. Cette action est nulle lorsqu'il s'agit de traiter une tuberculose due à une souche résistante. Ces résultats concordent avec ceux, déjà anciens, des auteurs américains (1, 2, 3).

2° Le P. A. S. a une action dans le traitement de la tuberculose expérimentale du cobaye. J. Solomidès et E. Bourland (4) ont expérimenté récemment le P. A. S. (solution dite « hyperactive » au 1/5, la solution utilisée par nous est au 1/10). Contrairement à nous, ces auteurs n'ont pas observé d'abcès locaux aux points d'injections. Leurs résultats thérapeutiques sont plus brillants que les nôtres. Mais nous opérons dans des conditions expérimentales différentes (avec eux, traitement immédiat, alors que nous préférons un traitement différé après l'inoculation). Feldman, Karlson, Hinshaw (5) ont traité la tuberculose du cobaye par le P. A. S. *per os* (1,60 g. par jour). L'effet thérapeutique a été obtenu au bout de cent dix-neuf jours de traitement. La durée trop courte du traitement (quarante-deux jours), la posologie trop faible (0,20 g.), expliquent sans doute l'action légère du P. A. S. observée par nous sur la tuberculose du cobaye due à la souche sensible.

3° L'association streptomycine + P. A. S. améliore légèrement l'action de la streptomycine dans le traitement de la tuberculose du cobaye due à la souche streptomycino-résistante. N'améliore pas le résultat obtenu par la streptomycine dans le traitement de la tuberculose due à la souche sensible.

(1) G. P. YOUNG et E. H. WILLISTON, *Proceed. Soc. exp. Biol. Med.*, 1946, **63**, 131.

(2) W. STEENKEN et E. WOLINSKY, *Am. Rev. Tub.*, septembre 1948.

(3) W. H. FELDMAN, A. G. KARLSON et HINSHAW, *Am. Rev. Tub.*, février 1948.

(4) J. SOLOMIDÈS et E. BOURLAND, *Ces Annales*, 1949, **77**, 310.

(5) W. H. FELDMAN, A. G. KARLSON et H. C. HINSHAW, *Proceed. Staff Meet. Mayo Clinic.*, 1947, **22**, 473.

Bloch et coll. (6), Karlson et Feldman (7) ont observé un effet synergique entre streptomycine et P. A. S. Cette opinion est partagée également par Youmans et Osborne, par Mac Closky, Smith et Frias (8).

ACTION DES TRAITEMENTS SUR LA STREPTOMYCINO-SENSIBILITÉ DES BACILLES. — Les rates de 2 animaux par groupe sont ensemencées sur milieu de Petragnani. Le titrage de la sensibilité des souches obtenues est fait en milieu de Dubos, dans des conditions bien définies (volume du milieu, poids de l'ensemencement, séjour à l'étuve). Les chiffres obtenus sont résumés dans le tableau suivant :

GROUPES	STREPTOMYCINO-SENSIBILITÉ (γ/cm^3)	
	Souche Fo au départ . 540	Souche H37 RV au départ : 0,54
Streptomycine	> 1.740	0,54
P. A. S.	540	0,54
Streptomycine + P. A. S. .	1.300	0,54

COMMENTAIRES. — 1° La souche H37 RV n'a pas vu sa sensibilité se modifier au cours du traitement par la streptomycine. Peut-être avons-nous échappé à cette éventualité, si fréquente, grâce à la brièveté des traitements, grâce aussi à une streptomycinémie élevée (une heure trente après une injection intra-musculaire de 0,005 g., nous avons trouvé en moyenne 6,2 γ par centimètre cube de sérum).

2° Par contre, la streptomycino-résistance de la souche Fo a considérablement augmenté (1.740 γ/cm^3).

3° Le P. A. S. associé à la streptomycine *semble avoir freiné* cette ascension (1.300 γ/cm^3).

4° Le P. A. S. seul ne modifie nullement la sensibilité de la souche résistante.

Ces constatations se rapprochent des premières constatations de di Marco (9). Elles se rapprochent également des constatations de Bloch et coll. (6) pour lesquels : le P. A. S. ne semble pas diminuer la streptomycino-résistance du B. K., le P. A. S. empêche (pour nous freine) l'acquisition de la streptomycino-résistance du B. K.

CONCLUSIONS. — De ce travail *in vivo* chez le cobaye, résultent certains faits intéressants :

1° Inaction totale de la streptomycine sur la tuberculose due à une souche résistante.

(6) J. R. BLOCH, H. VENNESLAND, EBERT et G. GOMORI, *Amer. Rev. Tub.*, 1949, **52**, 469.

(7) A. G. KARLSON et W. H. FELDMAN, *Proceed. Staff Mayo Clin.*, 1949, **24**, 510.

(8) W. T. MAC CLOSKY, M. I. SMITH et J. E. G. FRIAS, *J. Pharmacol.*, 1949, **92**, 447.

(9) DI MARCO, *1^{er} Congrès National des Antibiotiques*, 30 septembre 1948.

2° Action certaine du P. A. S. sur la tuberculose du cobaye.

3° Le P. A. S. seul ne semble pas modifier la streptomycino-résistance d'une souche de B. K. au cours d'un traitement. Il semble freiner, associé à la streptomycine, l'ascension rapide de la résistance du germe.

(Laboratoire de la Clinique des Maladies infectieuses de Lyon.
Institut National d'Hygiène.)

ÉTUDE *IN VITRO*

DE L'ACTION DU PARA-AMINO-SALICYLATE DE SODIUM (P.A.S.)

1° SUR LA SENSIBILITÉ DES SOUCHES DE B.K.

A LA STREPTOMYCINE

2° SUR LE POUVOIR BACTÉRIOSTATIQUE DE LA STREPTOMYCINE

par R. MARAL et A. BLANDIN.

PREMIÈRE PARTIE. — Nous avons étudié l'action du P. A. S. sur la streptomycino-sensibilité du bacille de Koch, après passages successifs des germes dans un milieu contenant, soit du P. A. S. seul (1), soit du P. A. S. associé à la streptomycine, soit de la streptomycine seule.

Méthode. — Deux souches de bacilles sont utilisées : la souche H 37 RV (streptomycino-sensible), la souche Fo... de notre collection (streptomycino-résistante). Titrage de la sensibilité des germes par la méthode des dilutions successives. Le milieu utilisé est celui de Dubos et Davis (2) [5 cm³ par tube]. Ensemencements uniformes des germes (0,2 mg.). Lecture des résultats au bout de dix jours d'étuve à 37°.

Après avoir titré au départ la sensibilité de ces deux souches, nous avons fait quatre repiquages successifs (un repiquage tous les dix jours), en suivant trois procédés :

Premier procédé : Repiquages en Dubos contenant des taux de P. A. S. et de streptomycine *légèrement* inférieurs à la moitié des taux bactériostatiques respectifs.

Deuxième procédé : Repiquages en Dubos contenant uniquement du P. A. S. à un taux inférieur de moitié au taux bactériostatique.

Troisième procédé : Repiquages en Dubos contenant uniquement de la streptomycine à un taux inférieur de moitié au taux bactériostatique.

Résultats obtenus. — a) Les sensibilités de départ sont les suivantes :

Streptomycino-sensibilité : souche H37 RV, 0,54 γ /cm³ ; souche Fo, 540 γ /cm³.

(1) Nous avons utilisé le P. A. S. Spécia (3817 RP).

(2) R. J. DUBOS et B. D. DAVIS, *J. exp. Med.*, 1946, **83**, 109.

Sensibilité vis-à-vis du P. A. S. (3) : souche H37 RV, 216 γ/cm^3 ; souche Fo, 352 γ/cm^3 .

b) *Après repiquages en Dubos contenant de la streptomycine et du P. A. S. :*

Streptomycino-sensibilité : souche H37 RV, 0,54 γ/cm^3 ; souche Fo, 540 γ/cm^3 .

c) *Après repiquage en Dubos contenant uniquement du P. A. S. :*

Streptomycino-sensibilité : souche H37 RV, 0,54 γ/cm^3 ; souche Fo, 370 γ/cm^3 .

d) *Après repiquages en Dubos contenant uniquement de la streptomycine :*

Streptomycino-sensibilité : souche H37 RV, 3,7 γ/cm^3 ; souche Fo, 5.400 γ/cm^3 .

On constate que, dans nos conditions expérimentales, la sensibilité à la streptomycine des souches de bacilles de Koch :

N'est pas modifiée, si le milieu contient du P. A. S. et de la streptomycine ;

N'est pas modifiée (ou légèrement diminuée) si le milieu contient du P. A. S. seul ;

Est considérablement augmentée si le milieu contient de la streptomycine seule.

DEUXIÈME PARTIE. — Nous recherchons *in vitro* s'il existe un effet synergique, additif, ou antagoniste, entre P. A. S. et streptomycine.

Méthode. — Dans ce but, nous avons étudié l'action des mélanges streptomycine + P. A. S. en proportions variables. Le titrage de l'activité est conduit comme ci-dessus : milieu de Dubos (5 cm^3), ensemencement uniforme, lecture au bout de dix jours d'étuve à 37°.

Résultats obtenus. — Nous les portons dans le tableau suivant. De plus, les taux bactériostatiques de streptomycine et de P. A. S. dans chaque mélange sont exprimés en pour 100 des taux bactériostatiques de streptomycine et de P. A. S. agissant seuls.

On voit que le P. A. S. et la streptomycine associés ont vis-à-vis des souches de bacille de Koch une action sensiblement additive (totaux des pour 100 des taux bactériostatiques au voisinage de 100 p. 100).

COMMENTAIRES ET CONCLUSIONS. — On sait que le principal inconvénient du traitement des affections tuberculeuses par la streptomycine réside dans l'apparition, parfois rapide, de la résistance des germes à l'antibiotique.

Le P. A. S., dont l'action bactériostatique sur le bacille de Koch a été mise en évidence pour la première fois par Jörgen Lehmann (4).

(3) Les concentrations bactériostatiques du P. A. S. sont plus élevées que celles indiquées par d'autres expérimentateurs (Youmans, Vennesland, Sievers). Elles se rapprochent de celles trouvées par Graessle et Pietrowski. Les différences s'expliquent par les conditions expérimentales, en particulier par l'importance de l'ensemencement, par la méthode de titrage.

(4) J. LEHMANN, *Lancet*, 1946, n° 6384, 15.

TAUX BACTÉRIOSTATIQUE de l'association Streptomycine + P. A. S. (γ/cm^3)		POURCENTAGE des taux bactériostatiques		
Streptomycine	P. A. S.	Streptomycine	P. A. S.	Total
<i>Souche H37 RV</i>				
0,54	0	100	0	100
0,27	50	50	22,9	72,9
0,22	100	40,7	45,8	86,5
0,18	125	33,3	57,3	90,6
0,06	150	11,1	68,8	79,9
0,04	162	7,4	74,3	81,7
0	216	0	100	100
<i>Souche Fo</i>				
540	0	100	0	100
460	50	88,8	14,2	103
370	150	68,5	42,9	111
180	250	33,3	71	104
0	325	0	100	100

présente l'intérêt majeur d'être actif aussi bien sur les souches streptomycino-sensibles que résistantes [Vennesland et coll. (5)].

Nouvel intérêt du P. A. S. : Goodacre et Seymour (6), Graessle et Pietrowski (7) ont montré expérimentalement que la résistance acquise au P. A. S. du bacille de Koch n'existe pas. On doit dire, cependant, que Delaude, Karlson et Carr auraient rencontré en clinique humaine des cas de résistance acquise au P. A. S. (8).

Il est très intéressant d'étudier *in vitro* l'activité de l'association des deux produits : streptomycine et P. A. S. Deux faits importants sont à retenir :

1° L'association de P. A. S. à la streptomycine empêche l'apparition de la streptomycino-résistance.

Ce résultat confirme les premières constatations de di Marco (9), de Graessle et Pietrowski (7).

2° L'association de P. A. S. à la streptomycine a été trouvée *additive*. Cet effet additif a été également reconnu par Vennesland et coll. (5), par Youmans (10).

(5) K. VENNESLAND, R. EBERT et R. G. BLOCH, *Proceed. Soc. exper. Biol. Med.*, 1948, **68**, 250.

(6) C. L. GOODACRE et D. E. SEYMOUR, *J. Pharm. Pharmacol.*, 1949, **11**, 788.

(7) O. E. GRAESSLE et J. PIETROWSKI, *J. Bact.*, 1949, **57**, 459.

(8) A. DELAUDE, A. G. KARLSON et D. T. CARR, *Proceed. Staff Meet. Mayo Clinic*, 1949, **24**, 341.

(9) DI MARCO, 1^{er} Congrès National des Antibiotiques, 1948.

(10) YOUNMANS, *J. Bact.*, 1947, **54**, 409.

Ces différentes constatations mettent en évidence l'intérêt de l'emploi du P. A. S. dans le traitement des affections tuberculeuses.

*(Laboratoire de la Clinique des Maladies infectieuses de Lyon.
Institut National d'Hygiène.)*

UTILISATION PRATIQUE D'UN POSEMÈTRE EN PHOTOMICROGRAPHIE

par P. MANIGAULT et Y. T. TCHAN.

Les recherches biologiques nécessitent de plus en plus souvent l'emploi de la photomicrographie, non seulement comme un moyen de présenter une illustration indiscutable des résultats acquis, mais aussi comme une véritable méthode complémentaire d'observation.

Il est utile, dans ces conditions, de rendre la prise de vue accessible à tout opérateur non entraîné. Quels que soient le type d'appareil employé et le mode d'adaptation au microscope, la première difficulté à résoudre est l'appréciation du temps de pose. On suggère volontiers de faire des photographies d'essai, développées exactement dans les mêmes conditions que les épreuves définitives. C'est un procédé lent. Il est coûteux si l'on doit multiplier les essais. Si l'on n'emploie qu'une seule plaque impressionnée par bandes successives ou placée derrière un coin optique à échelons, la détermination n'est valable que pour une préparation homogène occupant la plus grande partie du champ. Pour faire l'essai de photomicrographies de sujets isolés, on peut employer un système à fente appelé « multiplicateur », qui isole l'image du sujet, mais c'est un accessoire qu'on ne trouve pas souvent dans les laboratoires.

L'emploi d'une cellule photoélectrique, introduite à la place de l'oculaire et reliée à un galvanomètre sensible, permet d'ajuster l'éclairement de la plaque ou de la pellicule à une valeur connue. F. Obaton a montré la commodité et la précision de cette méthode. On ne fait de photographies d'essai qu'une fois pour toutes, afin de déterminer le temps de pose correct correspondant à une émulsion choisie. Puis, pour une prise de vue ultérieure on se contente d'ajuster l'éclairement de la surface sensible à la valeur qui a été choisie lors d'un étalonnage. Mais l'appareillage est d'un prix assez élevé. Il y a une façon simple et économique d'appliquer rapidement cette méthode, sans aucune modification aux dispositions habituelles du microscope. On place sur l'oculaire un posemètre du commerce sensible et fidèle (le Guerlux), déjà gradué en Lux. En écartant les diaphragmes, on découvre une fenêtre plane qui s'adapte fort bien sur les oculaires habituellement en service en Europe. La lumière parasite due à l'éclairage de la pièce n'intervient pas.

Nous avons trouvé par exemple qu'en employant la chambre du Leica placée à 30 cm. de la platine du microscope, avec la pellicule « Panatomic X Kodak », sans écran, le temps de pose correct est 1/60 de

seconde, quand l'aiguille du posemètre indique 75 Lux. Par la suite, en employant la même pellicule, et ce même montage photographique, le temps de pose correct sera toujours de 1/60 de seconde quand le posemètre indiquera 75 Lux, quelles que soient la préparation homogène observée et la combinaison optique adoptée.

Il peut arriver qu'à travers le système optique adopté l'éclairement prenne une valeur quelconque différente de 75 Lux. On peut alors s'efforcer de l'ajuster à 75 Lux, valeur pour laquelle le tableau des temps de pose a été établi. Mais on peut aussi se contenter d'introduire un coefficient de proportionnalité exprimé par un nombre *simple*, car la tolérance des émulsions photographiques permet d'assez grands écarts autour du temps de pose rigoureusement exact (sauf, bien entendu,



FIG. 1.

pour les émulsions actuelles destinées à des photomicrographies en couleurs).

Par exemple, avec le montage photographique et la même émulsion en employant le contraste de phase négatif de Koritska, objectif 26 X, oculaire 6 X, sans écran, l'éclairement tombe à 25 Lux, ce qui suffit pour déterminer le temps de pose.

En intercalant un filtre vert (Wratten, B-2, n° 58, coeff. 6 pour Panatomic-X), on atteint alors la valeur de 1/2 seconde (fig. 1).

Il vient évidemment à l'esprit que ce dispositif ne convient que pour des préparations homogènes remplissant tout le champ du microscope. Pour des préparations comportant des sujets isolés sur un champ clair, on peut procéder ainsi :

1° On éclaire le microscope en lumière polarisée en intercalant tout simplement un polaroïde sur le faisceau lumineux éclairant le microscope. Si l'objet est biréfringent il suffit de placer le polaroïde après l'objectif ou même derrière l'oculaire (fig. 2).

2° Puis on dispose une mince bandelette de polaroïde sur un anneau de carton que l'on place dans l'oculaire entre les lentilles, sur le diaphragme, à l'emplacement du micromètre oculaire.

3° On peut alors observer simultanément l'objet isolé dans le champ et la bandelette qui s'assombrit quand on tourne le polaroïde. On repère la position du polaroïde quand la bandelette paraît aussi sombre que l'objet.

4° Le coefficient qui doit modifier le temps de pose valable pour l'ensemble du champ est déterminé à l'avance, une fois pour toutes. Pour cela, on fait quelques mesures avec le posemètre et deux polaroïdes couvrant tout le champ, l'un immobile comme la bandelette,

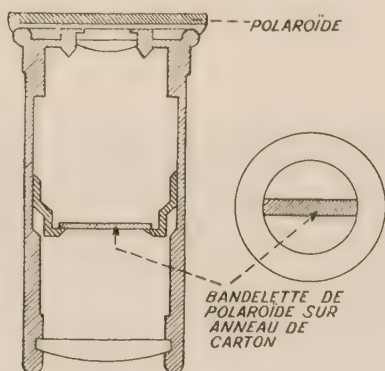


FIG. 2.

l'autre dont la rotation est repérée de la même manière que précédemment.

Il est parfois difficile de comparer la bandelette qui a un aspect gris neutre avec un objet microscopique coloré. Mais on peut améliorer les conditions de la comparaison en employant un écran coloré convenable ou mieux encore, en interposant entre les polaroïdes une lame demi-onde (en cellophane). La rotation de la lame remplace celle du polaroïde. Une lame demi-onde d'épaisseur convenable et bien orientée peut alors apparaître avec une couleur très voisine de celle de l'objet.

(Institut Pasteur.)

ÉTUDE DU POTENTIEL D'OXYDO-RÉDUCTION DE LA GÉLOSE PROFONDE

par M. MOUREAU.

Les bactéries anaérobies sont des germes qui ne peuvent se développer que dans un milieu de culture dont le potentiel d'oxydo-réduction présente une valeur suffisamment basse. La détermination

exacte de la valeur maxima de Eh compatible avec le départ de la culture des anaérobies a fait l'objet de nombreux travaux.

D'abord estimée à -70 mv à $\text{pH}=7$ (1), elle a été par la suite trouvée égale à $+110$ mv. (2), (3), (4), (5). La signification de ce Eh, maximum de départ, est d'ailleurs encore l'objet de nombreuses discussions. Elle est susceptible de varier suivant la nature des milieux de culture employés et encore plus avec le germe étudié (4). Il existe de nombreux types intermédiaires entre les anaérobies stricts et les anaérobies facultatifs (7).

Certains auteurs attribuent un intérêt plus grand à une notion différente: le Eh limite d'arrêt (5), (6).

Quoi qu'il en soit, sur le plan expérimental, les anaérobies stricts ne poussent pas sur les milieux ordinaires en présence d'air; il y a un intérêt direct indépendant de toute interprétation physiologique à préciser la valeur du Eh du milieu qui permet la culture des germes. Parmi ces milieux, un des plus couramment utilisés est la gélose profonde dont A.-R. Prévot (7) a étudié le rH après ébullition, en utilisant les colorants indicateurs d'oxydo-réduction.

Il nous a paru intéressant de reprendre cette étude en déterminant le Eh simultanément par les colorants d'oxydo-réduction et par la mesure électrométrique.

Description et schéma de l'appareil utilisé. — Nous avons utilisé un petit appareil analogue à celui utilisé par Seguin et Vincent (8), et permettant l'application simultanée des deux méthodes.

Un tube de verre de 16 mm. de diamètre et de 180 mm. de longueur (fig. 1) est fermé à une extrémité. (Le volume total est d'environ 30 cm^3 .) Deux orifices sont créés et mis en communication avec deux ampoules ouvertes à leur extrémité supérieure.

Les deux orifices destinés à mettre l'appareil en contact avec l'électrode au calomel du potentiomètre, par l'intermédiaire d'un pont de gélose saturée, peuvent être fixés à des hauteurs quelconques. Nous les avons fixés à l'union du $1/3$ inférieur et du tiers moyen, et à l'union du $1/3$ moyen et du $1/3$ supérieur de la longueur du tube.

Quatre électrodes en platine sont fichées à des hauteurs différentes à travers la paroi du tube et communiquent à l'extérieur avec des

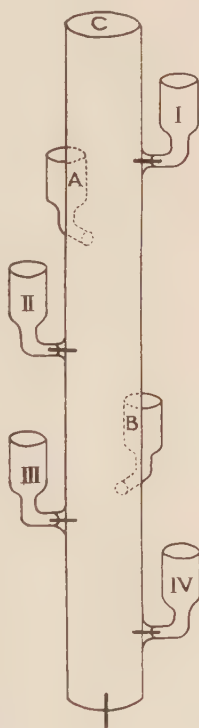


FIG. 1.

- (1) AUBEL, AUBERTIN et GENEVOIS, *Ann. Phys. et Phys. Ch. Biol.*, 1929, 5, 1.
- (2) KNIGHT et FILDES, *Biochem. J.*, 1930, 24, 1946.
- (3) KLIGER et GUGGENHEIM, *J. Bact.*, 1938, 35, 141.
- (4) HANKE et KATZ, *Arch. Biochem.*, 1943, 2, 183.
- (5) AUBEL, ROSENBERG et GRUNBERG, *C. R. Acad. Sci.*, 1945, 221, 190.
- (6) AUBEL, ROSENBERG et GRUNBERG, *Ces Annales*, 1948, 74, 216.
- (7) A.-R. PRÉVOT, *Bull. Soc. Phil.*, Paris, 1938, 121, 80.
- (8) P. SEGUIN et R. VINCENT, *Ces Annales*, 1938, 61, 255.
- (8 bis) R. VINCENT et DAUFRESNE, *C. R. Soc. Biol.*, 1938, 128, 770.

ampoules analogues aux précédentes. Une cinquième électrode est placée à l'extrémité inférieure de l'appareil.

Utilisation de l'appareil. — Afin de pouvoir mesurer le potentiel d'oxydo-réduction de la gélose aux différentes profondeurs, l'appareil était rempli stérilement de gélose ordinaire glucosée.

Les ampoules A et B étaient obturées par des bouchons de caoutchouc munis au centre d'un embout de verre. L'extrémité supérieure du tube, en C, est bouchée au coton comme un tube à essai ordinaire. Une fois ainsi préparé, il peut se conserver stérile.

Au moment des mesures, les ampoules A et B étaient ouvertes et chaque ampoule était emplie d'une solution de gélose saturée de KCl : les ampoules 1, 2, 3 et 4 recevaient chacune quelques centimètres cubes de mercure.

La jonction avec le potentiomètre se fait par l'intermédiaire de fils de cuivre qui plongent dans le mercure des ampoules, un contacteur permettant de choisir la dérivation dans l'ampoule 1, 2, 3 ou 4. Les deux ampoules A et B sont en communication avec l'électrode au calomel par l'intermédiaire de petits ponts de gélose saturée dont une extrémité est dans l'ampoule et l'autre dans un milieu liquide saturé de KCl où plonge l'électrode au calomel.

Des expériences variées ont permis de démontrer qu'une seule électrode au calomel en A ou B suffisait pour avoir une bonne conductivité.

Nous avons d'abord effectué des mesures dans la gélose régénérée sans colorant (9). La régénération s'obtenait en plongeant le tube dans un bain-marie bouillant. Lorsque la température de la gélose atteignait 100°, le chauffage était maintenu vingt minutes. Puis, retiré du bain-marie, l'appareil était refroidi, placé à l'étuve à 37° où avaient lieu les mesures.

Colorants indicateurs de E'o utilisés. — Ayant ainsi mesuré le potentiel de la gélose pure, nous avons ajouté au milieu des colorants (10).

Nous avons utilisé des indicateurs de E'o, choisis dans une zone qui était réductible par la gélose régénérée. Le colorant employé à la dose de 1/1.000, dilué dans de l'eau distillée, filtré, était versé dans le fond de l'appareil avant l'introduction de la gélose et la régénération.

Les colorants étaient :

	E'o
1. Thionine	+ 0,062
2. Bleu de crésyl brillant	+ 0,045
3. Bleu de méthylène	+ 0,044
4. Potassium indigo tétra sulfonate.	— 0,046
5. Potassium indigo tri-sulfonate	— 0,081
6. Bleu de Nil	— 0,116
7. Potassium indigo disulfonate	— 0,125

Les valeurs d'E'o ont été relevées dans les *Tabulæ Biologicae* (11).

(9) Le pH de la gélose variait selon les lots, de 7,2 à 7,6.

(10) Les colorants nous ont été aimablement donnés par M^{me} Grumberg-Manago, que nous sommes heureux de remercier ici.

(11) *Tabulæ Biologicae*, 1935, 40, 5.

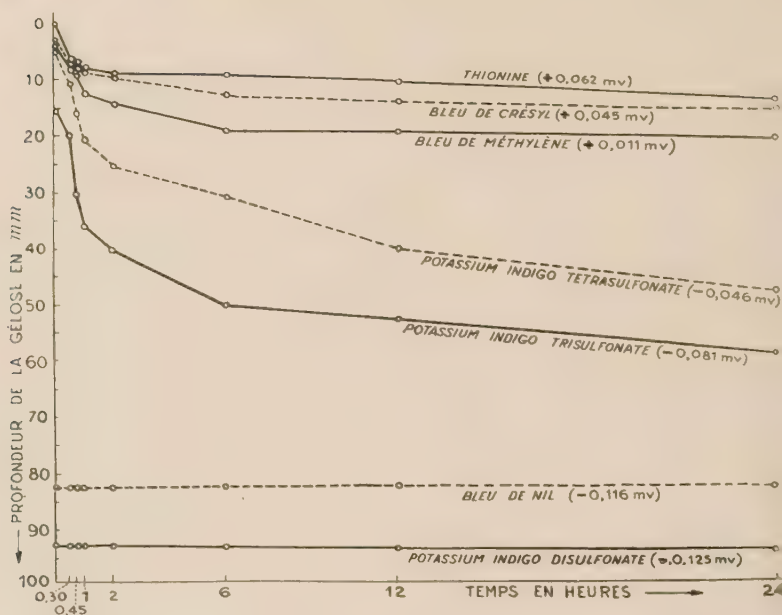


FIG. 2.

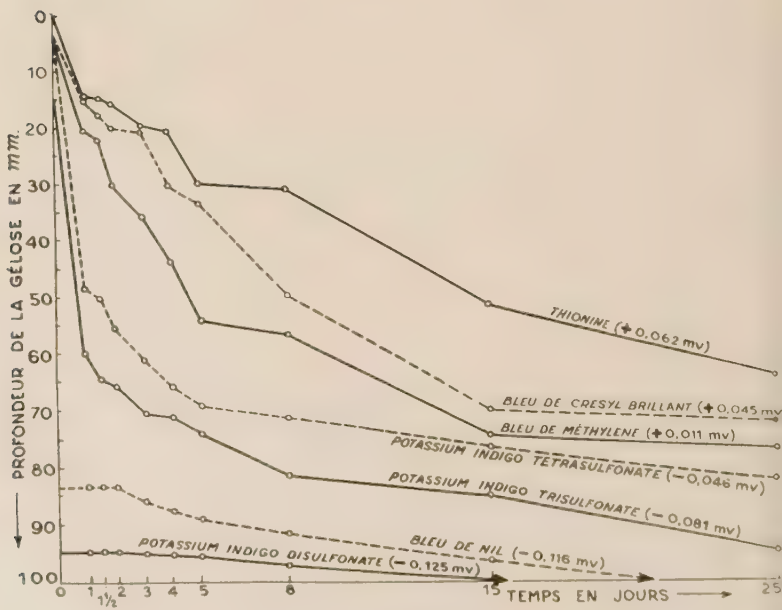


FIG. 3.

Les courbes ci-jointes correspondent aux variations de la hauteur de recoloration en fonction du temps. Le premier ensemble correspond à la période 0 — 24 heures, le second à la période 0 — 15 jours.

CONCLUSIONS.

La gélose profonde régénérée par ébullition en vue d'y provoquer l'anaérobiose nécessaire à la culture des bactéries anaérobies stricts présente des valeurs du potentiel d'oxydo-réduction qui varient ;

1° En fonction de la distance du point considéré à la surface libre.

2° Pour un même niveau, en fonction du temps.

Ces valeurs de Eh ont été déterminées par la méthode colorimétrique directe dans les tubes de 16 mm. de diamètre.

Les résultats confirment, en les précisant, les données antérieures obtenues par divers auteurs.

(Institut Pasteur. Service des Anaérobies.)

MUTATIONS *IN VIVO* CHEZ UN *PARACOLOBACTRUM* [?] (*)

par R. BUTTIAUX et A. KESTELOOT.

L'étude des *B. paracoli* a été l'objet d'un nombre important de communications ou travaux d'ensemble. Dans deux articles antérieurs (1, 2), nous avons insisté sur les caractères biochimiques « mouvants » de ces microbes. Certains d'entre eux exigent parfois un certain temps pour se fixer sur milieux de culture. Cependant, il a jusqu'à présent été difficile de signaler des mutations nettes chez ce groupe d'Entérobactéries dénommées par Borman, Stuart et Wheeler *Paracolobactrum* (3).

Nous avons observé une série de faits curieux qui peuvent faire penser à l'existence de mutations importantes biochimiques et antigéniques *in vivo* chez un *Paracolobactrum* intermédiaire. Il a été isolé dans les matières fécales d'un homme présentant une diarrhée persistante avec hyperthermie, en traitement dans le service de gastro-entérologie de l'hôpital Saint-Sauveur de Lille (professeur Auguste).

Le 25 février 1949, une première coproculture met en évidence un *Paracolobactrum intermedium*, dit P. C. I. 9. 149 caractérisé par la présence à un taux élevé des antigènes de *Salmonella* = I, II — a — lv —. L'existence des antigènes somatiques I, II n'est pas extraordinaire. Les *B. paracoli* de nos régions du nord de la France les possèdent parfois et nous l'avons déjà signalé (1, 2). Par contre, la coexistence des antigènes flagellaires a et lv est exceptionnelle. Ce caractère distinctif

(*) Travail effectué en partie grâce à une allocation de recherches de l'Institut National d'Hygiène.

(1) R. BUTTIAUX et A. KESTELOOT, *Ces Annales*, 1948, 74, 429.

(2) R. BUTTIAUX et A. KESTELOOT, *Annales Inst. Pasteur Lille*, 1948, 4, 103.

(3) E. K. BORMAN, G. A. STUART et K. M. WHEELER, *J. Bact.*, 1944, 48, 351.

est à la base des déductions que nous tirerons ultérieurement des faits.

Le 30 mars 1949, une seconde coproculture nous fait retrouver le même germe. Il n'existe à ce moment aucune modification biochimique ou antigénique. Il est appelé P. C.I. 14.691.

Le 8 juin 1949, une troisième coproculture montre la disparition du *P. C. intermedium* et l'existence de deux nouvelles variétés biochimiques de *Paracolobactrum*.

Un *Paracolobactrum coliforme* dit P. C. C. 25.297.

Un *Paracolobactrum aerogenoides* dit P. C. A. 25.297.

Chose curieuse, ces deux variétés biochimiques ont le même caractère exceptionnel que les deux *P. C. intermedium* antérieurement isolés. Ils possèdent les antigènes des *Salmonella* I, II, a, l, v.

Les caractères biochimiques de ces 4 *Paracolobactrum* sont indiqués dans le tableau 1.

TABLEAU 1.

	P. C. I. 9 149	P. C. I. 14.691	P. C. C. 25.297	P. C. A. 25.297
Mobilité (agar 5 p. 1.000).	+++	+++	+++	+++
Lactose 10 p. 1000.	+ 3 (1)	+ 3	+ 5	+ 5
Lactose 100 p. 1000 (2). . .	+ 1	+ 1	+ 2	+ 1
Glucose.	+	+	+	+
Saccharose.	0	0	0	+ 1
Mannite.	+	+	+	+
Maltose.	+	+	+	+
Dulcité.	0	0	0	0
Salicine.	+ 3	+ 3	+ 1	+ 1
Adonite.	+	+	0	0
Inosite.	+	+	0	0
Arabinose.	+	+	+	+
Xylose.	+	+	+	+
Glycérine.	+	+	+	+
Indole.	+	+	+	0
R. M. T.	+	+	+	+
Acétyl-méthyl-carbinol. . .	0	0	0	+
Citrate (Simmons).	+ 1	+ 1	0	+ 1
Tartrate.	+	+	+	0
H ₂ S.	0	0	0	0
Gélatine.	0	0	0	0
Urée (Christensen).	+	+	0	+
Nitrates.	+	+	+	+

(1) Les chiffres indiquent le nombre de jours nécessaires au virage de l'indicateur.

(2) Recherche effectuée sur gélose lactosée de la formule suivante que nous employons maintenant pour nos études de *Paracolobactrum*.

Bacto peptone (Difco).	10 g.
Yeast extract (Difco).	1 g.
Acide para-aminobenzoïque.	0.03 g.
Agar.	22.5 g.
Bromo-crésol pourpre.	0.02 g.
Eau.	1.000 cm ³

Ajuster à pH 7. Répartir 4 cm³ par tube. Autoclaver vingt minutes à 120°. Au moment de l'emploi, ajouter 2 cm³ d'une solution de lactose à 30 p. 100 filtrée sur bougie Chamberland, au tube de base ramené à 50° C. Incliner de façon à avoir un culot épais 3 cm³ et une petite tranche. Inoculer le culot et la tranche. Certains P. C. fermentent le lactose beaucoup plus vite dans le culot que sur la tranche de gélose.

Le tableau I montre qu'il n'existe aucune différence biochimique entre P. C. I. 9.149 et P. C. I. 14.691. Par contre, le P. C. C. 25.297 et le P. C. A. 25.297 se différencient surtout des deux précédents, soit par leur capacité de production d'indole et d'acétyl-méthyl-carbinol, soit par leur utilisation du citrate de sodium, c'est-à-dire par les tests fondamentaux qui règlent leur classification en *P. C. coliforme*, *P. C. intermedium*, *P. C. aerogenoïdes*.

Il faut signaler que le P. C. I. 14.691 présente une dissociation curieuse. Cultivé sur gélose au bromo-crésol pourpre, lactosée à 10 p. 1.000, il donne deux sortes de colonies : les unes larges (3 à 4 mm.), opaques, les autres petites (1 mm.), transparentes. Toutes deux ont les mêmes caractères biochimiques. Les petites colonies portées sur gélose au bromo-crésol pourpre, lactosée à 100 p. 1.000 donnent de très larges colonies muqueuses comparables à celles des *Klebsiella*. Leur structure chimique est actuellement à l'étude ; il ne semble pas s'agir de formes capsulées, mais de la production d'une « substance muqueuse ».

Les P. C. I. 9.149 et 14.691, le P. C. C. 25.297, le P. C. A. 25.297, possédant une même liaison antigénique : I, II, *a*, *lv*, il était important d'étudier leur structure antigénique complète. Nous avons préparé, à cet effet, un certain nombre de sérums agglutinants totaux (O + H) par injection des souches vivantes au lapin.

Signalons de suite que la fraction *lv* est peu importante dans toutes les souches étudiées. Ces dernières, cultivées sur gélose nutritive, additionnée de sérum anti-*a*, perdent cet antigène *a*, mais le taux d'agglutinabilité de *lv* n'augmente pas (1/100).

Un sérum anti-S. paratyphi A agglutine les 4 P. C. aux taux suivants :

P. C. I. 9.149 = 1/1.200. P. C. I. 14.691 = 1/900.

P. C. C. 25.297 = 1/900. P. C. A. 25.297 = 1/900.

S. paratyphi. A = 1/5.120.

Le sérum obtenu avec la souche P. C. I. 14.691 fournit avant et après saturations diverses les résultats les plus intéressants et qui sont rapportés dans le tableau II.

TABLEAU II.

	P. C. I. 9 149	P. C. I. 14.691	P. C. C. 25.297	P. C. A. 25.297	S. PARA A
Sérum P. C. I. 14.691 . . .	10.240	10.240	1.280	1.280	1.280
Sérum P. C. I. 14.691 saturé par P. C. C. 25.297 . . .	2.560	2.560	20	80	320
Sérum P. C. I. 14.691 saturé par P. C. A. 25.297. . . .	2.560	2.560	80	20	160
Sérum P. C. I. 14.691 saturé par S. paratyphi A. . . .	8 000	8.000	160	160	40

Nos recherches ont montré : 1° l'identité antigénique des P. C. I. 9.149 et 14.691, vérifiée par l'épreuve inverse (sérum 9.149 sur 14.691) ; 2° en dehors des antigènes I, II, *a*, *lv*, des *Salmonella*, les deux *P. C. intermedium* possèdent peut-être encore, à un taux relativement

faible, des fractions antigéniques communes avec les *P. C. C.* 25.297 et *P. C. A.* 25.297 ; 3° mais ils s'en différencient par l'existence de larges fractions antigéniques distinctes (vérifié par épreuve inverse) ; 4° chose importante, le *P. C. coliforme* 25.297 a la même structure antigénique que le *P. C. aerogenoides* 25.297 isolé du même échantillon fécal que lui (vérifié par épreuves croisées).

Les faits que nous venons d'exposer nous incitent donc à supposer que le *P. C. intermedium* 9.149, qui, chez notre malade, n'avait pas présenté de mutation après trente-trois jours, a pu se transformer en trois mois en deux mutants différents au point de vue biochimique = *P. C. coliforme* et *P. C. aerogenoides*. Ces deux mutants se distinguent également mais incomplètement du *P. C. intermedium*, initialement isolé, par leur composition antigénique. Notre hypothèse nous semble étayée par ce caractère exceptionnel des 4 *P. C.* étudiés : la présence des antigènes de *Salmonella* I, II, a, lv. Il n'y a pas naturellement, dans les constatations de ce genre, la possibilité d'assurer qu'il s'agit d'une mutation, mais nous avons cru important de rapporter cette observation. Elle incite à renouveler ces recherches chez d'autres sujets sains ou malades, porteurs de *Paracolobactrum*. Elle confirme à nouveau, nous le croyons, la position « intermédiaire » de ces germes entre les différents genres d'*Enterobacteriaceæ*. Nous reviendrons par ailleurs, avec plus de détails, sur les mutations des *Paracolobactrum*.

(Institut Pasteur de Lille. Laboratoire d'Hygiène expérimentale.)

SUR UN *FLAVOBACTERIUM* FECALÉ ISOLÉ D'UNE HÉMOCULTURE

par P. SÉDALLIAN, M. CARRAZ et R. MARAL.

Nous avons isolé par hémoculture, à plusieurs reprises au cours d'une forte pyrexie chez une malade présentant une anémie aiguë grave avec leucopénie et lymphocytose, un bacille mobile à Gram négatif, non capsulé, se développant sur les milieux ordinaires non glucosés en aérobiose et en anaérobiose. Sur eau peptonée, bouillon ordinaire, bouillon au placenta ordinaire, il donne un trouble homogène avec collerette. Après culture de vingt-quatre heures à l'étuve à 37°, par agitation, on soulève un sédiment jaunâtre légèrement visqueux.

Sur gélose ordinaire la végétation est rapide et abondante et il se présente sous forme de grosses colonies convexes, lisses et franchement jaunâtres.

Il liquéfie la gélatine en cône et nous avons mis en évidence une gélatinase sur plaque de gélose-gélatine de Frazier. Il liquéfie en outre rapidement le sérum coagulé de cheval.

Il ne produit pas d'indol. Il réduit très fortement les nitrates en nitrites.

Il produit de l'hydrogène sulfuré en petites quantités, seulement près quarante-huit heures d'étuve à 37°.

Il utilise le citrate en faisant virer au bleu la gélose de Koser-Simmonds.

La réaction de Voges-Proskauer est négative ainsi que la réaction au rouge de méthyle.

Ce germe ne semble utiliser aucun hydrate de carbone. Même après plusieurs jours d'étuve à 37°, il n'y a ni dégagement de gaz, ni dégagement d'acide à partir de lactose, glucose, saccharose, arabinose, xylose, maltose, lévulose, galactose, glycérol, dulcité, dextrine. L'amidon et le mannitol sembleraient très légèrement attaqués.

La gélose à l'esculine vire au brun noirâtre.

Nous avons essayé à partir de cultures sur gélose d'extraire le pigment jaune produit par ce germe, par l'éther, l'alcool, le chloroforme, l'acétone en milieu acide ou alcalin. Nos essais furent infructueux.

Le sérum de la malade, ainsi qu'un sérum de lapin préparé avec une émulsion de ce germe, n'agglutinent pas diverses émulsions du groupe *Salmonella* (Eberth, Para A, Para B, Para C, Gärtner-Aertrycke), et du groupe des *Shigella* (Strong, Hiss, Shiga, Flexner). Ce germe n'a par ailleurs aucun caractère pouvant l'assimiler à un *Pseudomonas aeruginosa*.

Ce germe est peu pathogène pour l'animal. Même avec de fortes doses le cobaye, en injection intramusculaire et intrapéritonéale, le lapin en injection intraveineuse, ne sont pas sensibles.

Par contre, la souris, avec de très fortes doses, succombe en huit jours après injection intramusculaire ou intrapéritonéale, mais on ne peut déceler le germe par hémoculture chez cet animal.

La résistance à la pénicilline et à la streptomycine déterminée par la méthode des dilutions en bouillon ordinaire est de 31 U. O./cm³ pour la pénicilline et 25 γ cm³ pour la streptomycine. Le traitement à la pénicilline et à la streptomycine institué chez la malade fut sans effet.

On se trouve donc en présence d'un germe à Gram négatif, présentant un pigment jaune et caractérisé par son activité biochimique nulle à l'égard des hydrates de carbone. Il semble que l'on puisse le rattacher à *Flavobacterium fecale* (1) ou à une espèce très voisine, car il s'en différencie cependant par sa mobilité et son action sur les nitrates.

La présence dans le sang de *Flavobacterium fecale* n'a jamais été signalée. Cependant, dans le cas présent, l'affection qui frappait notre malade se cataloguait dans le groupe des agranulocytoses et il n'est pas certain que le germe isolé à plusieurs reprises par hémocultures, soit à l'origine de la maladie constatée, l'agranulocytose se compliquant habituellement secondairement de septicémies à streptocoque, à bacille pyocyanique, etc...

(Laboratoire de Bactériologie et Clinique des Maladies Infectieuses
de la Faculté de Médecine et Pharmacie de Lyon.)

(1) STUTZER, *Bacillus fecale aromaticum*. Zentralbl. Bakt. I., 1923, 91, 87
— BERGEY, *Manual of determinative Bacteriology*, 3^e éd., 1930, 150.

ABSENCE DE POUVOIR PATHOGENE, POUR LE SINGE, DES ANAÉROBIES DU GENRE *ACTINOBACTERIUM*

par E.-R. BRYGOO.

La reproduction expérimentale des actinomycoses à anaérobies reste à l'ordre du jour, car, en dehors de son importance intrinsèque, elle est ou devrait être la seule méthode d'appréciation des thérapeutiques anciennes et à venir : roentgenthérapie, chimiothérapie et antibiotiques.

On sait combien l'actinomycose expérimentale est difficile à reproduire. Les travaux anciens de Wolf et Israël, de Kruse, de Wright, de Lord avaient déjà mis l'accent sur l'irrégularité des résultats et l'inconstance des lésions obtenues, quels que soient l'animal mis en expérience et la voie utilisée. Ultérieurement, d'autres auteurs reprennent la question et obtiennent des résultats plus satisfaisants : O. Grooten, en 1934, utilise le lapin ; elle injecte par voie intrapéritonéale une culture en gélose et obtient après plusieurs mois des nodules et des grains typiques.

Mathieson, Harrison, Hammond et Henrici, en 1935, expérimentant sur des cobayes n'obtiennent jamais de résultats par une injection unique, mais par des injections répétées reproduisent une actinomycose caractéristique avec grains jaunes 4 fois sur 9.

Plus près de nous enfin, J. Slack d'une part, Rosebury et ses collaborateurs d'autre part, obtiennent également des résultats positifs : Slack (1), utilisant des souches d'*Actinomyces* — dont la détermination précise n'est malheureusement pas donnée — souches isolées d'amygdales humaines, obtient des résultats positifs chez 4 lapins et 1 cobaye par des injections intraveineuses de quantités importantes de germes ; Rosebury, Epps et Clark (2), essayant de confirmer les résultats de Slack, obtiennent des résultats positifs avec 3 souches sur 9 d'*A. israeli*, par des injections massives et répétées.

Ils expérimentaient sur des lapins et des cobayes ; 5 animaux sur 40 présentèrent une actinomycose. Les lésions étaient du type granulaire généralisé, un seul animal, un lapin atteint d'une forme bénigne présentait des masses.

On voit par ce rapide exposé, que si l'actinomycose expérimentale a été obtenue d'une manière indubitable, les résultats sont cependant toujours très aléatoires, bien que les auteurs se soient adressés à de nombreuses espèces animales (souris, cobayes, lapins, chiens, cochons, vaches, chevaux) et que les voies les plus diverses aient été expérimentées (intracrânienne, intraoculaire, intrafœtale) : la maladie expé-

(1) J. SLACK, *J. Bact.*, 1942, 43, 193.

(2) ROSEBURY, EPPS et CLARK, *J. inf. Dis.*, 1944, 74, 131.

rim mentale ne peut donc pas encore être utilisée pour des essais thérapeutiques.

Les travaux de Prévot (3, 4, 5) et de ses collaborateurs (6, 7), ont montré que les actinomycoses anaérobies sont dues au moins à 4 germes : *A. israeli*, *A. abscessus*, *A. meyeri* et *A. cellulitis*.

Il pouvait être intéressant de vérifier si le singe, espèce qui n'avait pas encore été utilisée, ne présentait pas une sensibilité particulière aux Actinomycètes. Nous avons essayé de reproduire les lésions de l'actinomycose sur des cynocéphales.

Les souches utilisées furent : *A. abscessus*, isolée un an avant d'une actinomycose cervico-faciale humaine ; *A. israeli*, isolé cinq ans avant d'une lésion spontanée du cobaye ; *A. cellulitis*, isolée huit mois avant d'une cellulite jugale humaine.

1° Trois singes ont été inoculés, chacun avec l'une de ces souches, par voie sous-cutanée, dans la région sous-angulo-maxillaire, avec 5 cm³ d'une culture riche en bouillon V. F. gélosée. L'injection était répétée, au même endroit, cinq jours après.

Ces 3 singes ont, trois jours après la seconde injection, présenté une volumineuse fluxion, dure, s'ulcérant rapidement, guérissant en quelques jours en ne laissant qu'une induration fibreuse sous-maxillaire. La reprise du germe a été négative.

En vue de vérifier si les violentes réactions inflammatoires constatées lors de ces injections ne pouvaient être provoquées par le seul bouillon V. F. gélosé, un cynocéphale a reçu à cinq jours d'intervalle deux injections de 5 cm³ de gélose stérile dans la région sous-angulo-maxillaire. Il ne s'est produit aucune réaction inflammatoire, c'est à peine si, pendant quelques jours, on put percevoir un petit nodule profond, qui ne tarda pas à disparaître. Il semble donc démontré que les phénomènes inflammatoires sont bien le fait des produits microbiens injectés, la réaction locale étant sans doute favorisée par l'enrobage en gélose, qui, évitant une diffusion trop rapide, permet une réaction efficace et une évacuation locale.

2° Deux singes ont été inoculés avec des cultures denses, en bouillon V. F. d'*A. abscessus* ; l'un par voie sous-cutanée dans la région sous-angulo-maxillaire, l'autre par voie intra-veineuse. Ils ont reçu cinq injections de 5 cm³, au rythme d'une tous les trois jours.

Les 5 cynocéphales n'ont présenté aucun signe pathologique. L'un d'eux est mort d'une bronchopneumonie, deux mois après le début de l'expérimentation. Une autopsie minutieuse, complétée par de nombreux examens histo-pathologiques, n'a montré aucune lésion actinomycosique. Les 4 autres ont été sacrifiés, au cours d'expériences ultérieures, trois mois et demi après les injections d'*Actinobacterium*. L'autopsie n'a permis de relever aucune lésion pouvant être rapportée à une origine actinobactérienne.

Ces résultats négatifs, qui s'ajoutent à la liste déjà longue des échecs

(3) A.-R. PRÉVOT, *Rev. Stomatol.*, 1948, 49, 1.

(4) LACRONIQUE, PRÉVOT, BEAL et GOUDAERD, *Rev. Stomatol.*, 1948, 49, 421.

(5) LATTES, GIRALDI, ROUSSEAU, PRÉVOT et LINHARD, *ibid.* (sous presse).

(6) RAYNAUD, ROBIN et DE LAJUDIE, *Ces Annales*, 1948, 74, 333.

(7) J. LINHARD, *Ces Annales*, 1949, 76, 478.

de l'actinomyose expérimentale, ne font que souligner les inconnues du problème de la virulence et de la spécificité pathogénique dont la flore anaérobie donne de si nombreux exemples.

(Institut Pasteur, Service des Anaérobies.)

ISOLEMENT D'*HEMOPHILUS PERTUSSIS* SUR MILIEU ADDITIONNÉ DE SUC ALLANTOÏDIEN D'ŒUF DE POULE INCUBÉ

par ANDRÉ BERTOYE (1)

La pousse rapide des germes sur l'œuf embryonné de poule nous a incité à essayer l'adjonction de suc allantoïdien au milieu classique de Bordet pour tenter d'obtenir une pousse plus rapide.

La technique adoptée est la suivante : On prépare un milieu classique de Bordet (extrait glycérimé de pomme de terre) qui est conservé à la glacière. Au moment de l'utilisation il est mis au bain-marie, porté à ébullition et ramené à la température de 40°. On ajoute alors 20 p. 100 environ de sang humain défibriné, prélevé depuis moins de huit jours (et mis à 37° avant de le mélanger au milieu).

Sur un œuf de poule incubé de dix à douze jours, on prélève extemporanément du suc allantoïdien par ponction aseptique, à l'aide d'une seringue stérile avec aiguille montée. Il suffit de pratiquer sur la coquille, au niveau du sac allantoïdien, un petit orifice où se fera la ponction, et un autre orifice au niveau de la poche à air pour permettre l'équilibre des pressions dans l'œuf.

Au milieu de Bordet préparé comme ci-dessus et encore tiède (40° environ), on ajoute 1 à 2 cm³ de suc allantoïdien pour 100 cm³. La quantité de suc ne paraît avoir aucune influence, bien que nous n'ayons jamais utilisé moins de 1 cm³ pour 100 cm³ de milieu initial.

On coule alors en boîtes de Petri ; la teinte du milieu ainsi obtenu est un peu plus claire que celle « rouge cerise » du milieu de Bordet classique. Les boîtes sont mises en glacière et utilisées dans les quatre ou cinq jours.

Ce milieu a été essayé pour l'isolement et pour le repiquage d'*Hemophilus pertussis* et a donné les résultats suivants :

Pour l'isolement chez le coquelucheux. — Le prélèvement est pratiqué par la méthode de l'écouvillonnage pharyngé de Bradford utilisant un écouvillon en fil métallique souple tressé introduit par les narines jusqu'au contact de la paroi pharyngée. On dépose à la surface du milieu à ensemencer 1 goutte (prélevée à l'ose refroidie) de solution de pénicilline G à 500 unités au centimètre cube. L'écouvillon qui a servi au prélèvement est remué circulairement dans cette goutte de façon à

(1) Nous remercions M^{lle} R. Bertoye et M^{lle} S. Porte pour l'aide qu'elles nous ont apportée dans ce travail.

avoir un cercle de 10 à 15 mm. de diamètre environ. Puis on fait des stries avec une òse. L'incubation est faite à 36° en atmosphère humide (pratiquement au-dessus d'un cristallisoir rempli d'eau).

La pousse est obtenue en quarante-huit heures, alors qu'avec un milieu normal il faut trois ou quatre jours. Les colonies de très petites dimensions au début ont, à jour frisant, un aspect moiré caractéristique. Dès le troisième jour, leur dimension est celle d'une tête d'épingle. Elles sont nettement délimitées, arrondies, adhérentes au milieu et ne fuyant pas sous l'òse qui les prélève. Leur teinte est plus claire que sur milieu de Bordet ordinaire, gris un peu nacré et non en gouttelettes de mercure comme classiquement.

Il nous a semblé que l'hémolyse était moins nette que dans le milieu habituel, mais l'agglutination par sérum spécifique et l'aspect morphologique des germes demeurent inchangés (2). Les mêmes différences d'aspect des colonies et de délai de pousse que celles classiquement notées persistent entre *Hemophilus pertussis* et *Hemophilus influenzae*.

Dans les repiquages successifs, nous n'avons noté aucune différence dans la rapidité d'apparition des colonies entre les deux milieux. La pousse ne commence à être visible qu'en quarante-huit heures ; elle n'est pas plus abondante, mais les colonies conservent un aspect plus clair sur milieu additionné de suc allantoïdien.

On peut discuter la nature de l'élément apporté par le suc allantoïdien et, en particulier, admettre que son action est due aux protéines qu'il contient. On sait, en effet, qu'on a préconisé l'adjonction de peptones pour améliorer la pousse d'*Hemophilus pertussis*. Mais l'utilisation de cette dernière méthode a donné des pousses plus constantes, mais non plus rapides, du germe à son isolement.

L'action du suc allantoïdien, dans la rapidité de l'isolement du germe à partir de l'organisme, semble être plutôt en faveur de l'existence dans l'œuf de poule incubé ou, du moins, dans son suc allantoïdien, d'un facteur de départ pour *Hemophilus pertussis*.

L'utilisation du milieu de Bordet ainsi modifié paraît intéressante, car elle permet un diagnostic bactériologique de la coqueluche en quarante-huit heures, donc plus rapide que par la méthode classique.

(Laboratoire de la Clinique des Maladies infectieuses et de Bactériologie.
Faculté de Médecine, Lyon [Professeur P. SÉDALLIAN].)

(2) De même par injection intradermique au lapin de germes cultivés sur le milieu modifié, on obtient la nécrose dans des délais normaux.

ÉTUDE D'UNE SOUCHE DE VIRUS D'HÉPATITE ÉPIDÉMIQUE LÉSIONS HISTOLOGIQUES DU FOIE D'EMBRYON DE POULET

par ANDRÉ BERTOYE et RENÉ BRETTE (1).

Ayant eu l'occasion de constater un cas d'ictère prolongé, présentant les caractères cliniques de l'hépatite épidémique, nous avons tenté d'isoler sur œuf de poule incubé le virus à partir du suc duodénal du malade.

Il s'agissait d'un enfant de quatorze ans, Georges D..., venant d'une commune de l'Ardèche où plusieurs cas semblables avaient été constatés. Lui-même atteint d'ictère avec hépatosplénomégalie, polyadénopathie, est admis dans le service du Dr Paliard le 18 janvier 1949 et transféré dans le service du professeur Sédallian une semaine après. C'est là que l'essai d'isolement du virus fut effectué, soit environ sept semaines après le début de l'affection.

Le suc duodénal prélevé par tubage est immédiatement inoculé dans 4 œufs embryonnés de dix jours de la façon suivante : le liquide pathologique est mélangé à parties égales avec une solution de sérum physiologique contenant 1.000 unités de pénicilline et 500 γ de streptomycine, suivant la méthode, modifiée par adjonction de streptomycine, proposée par Hirst pour l'isolement du virus grippal (2). Inoculation de 0,1 cm³ du mélange sur la membrane chorio-allantoïdienne et mise à l'étuve à 36°.

Les foies des embryons sont prélevés au septième jour, broyés dans du sérum physiologique et passés à d'autres œufs incubés, en plusieurs séries, avec et sans adjonction d'antibiotiques. Des contrôles de stérilité sont effectués au moment des passages et on élimine les œufs ayant eu une contamination accidentelle.

Nous n'avons pas constaté de mortalité embryonnaire en série comme l'avaient noté Siede et Medin (3), Siede et Lutz (4) au cours d'essais analogues avec du suc duodénal filtré. Par contre, l'examen histologique des foies prélevés sur embryon vivant et fixés au Bouin nous a montré des lésions du parenchyme hépatique.

A côté de la réaction hématopoïétique normale avec volumineux îlots situés en plein parenchyme et composés d'éléments de toute la série sanguine, avec parfois des cellules en caryokinèse, existent aussi des lésions inflammatoires situées au contact de vaisseaux qui sont très dilatés. Les éléments inflammatoires eux-mêmes sont de type lympho-

(1) Nous remercions M^{lle} R. Bertoye et M^{lle} S. Porte pour l'aide qu'elles nous ont apportée dans ce travail.

(2) G. K. HIRST, *Proceed. Soc. exp. Biol. Med.*, 1945, **58**, 155.

(3) SIEDE et MEDIN, *Klin. Wochenschr.*, 1941, **20**, 1065.

(4) SIEDE et LUTZ, *Klin. Wochenschr.*, 1943, **22**, 505.

cytoïde, peu volumineux, à protoplasma assez clair et noyau unique ; ils sont parfois accompagnés par des éléments de la série rouge, mais l'absence de polynucléaires est caractéristique. Il semble bien ne pas s'agir d'une réaction hématopoïétique, qui est intra-parenchymateuse, ou du moins c'est une réaction très différente de la réaction normale.

Il faut noter, en outre, que l'on trouve sur quelques coupes des grains de pigments brunâtres, de répartition assez diffuse, mais cependant nettement prédominants dans la région périvasculaire et qui paraissent être d'origine biliaire. D'autre part, l'on constate parfois des altérations cellulaires marquées avec vacuolisation et aspect pycnotique des noyaux.

Ces lésions parenchymateuses sont peu intenses et d'interprétation délicate. On est, en effet, en présence d'un tissu jeune sur lequel les colorants habituels peuvent avoir une certaine action destructrice. D'autres recherches sont nécessaires pour en affirmer la spécificité, mais, dans les examens de contrôle que nous avons pu pratiquer sur des foies d'embryons soit normaux, soit inoculés avec de la pénicilline et de la streptomycine, nous n'avons pas vu d'aspects absolument comparable. D'autre part, ces lésions ne sont pas retrouvées dans toutes les séries que nous avons faites à partir de l'isolement initial, mais nous avons pu en constater dans un dixième passage.

Des lésions histologiques du foie ont été signalées par certains auteurs dans les essais de transmission du virus de l'hépatite : corps élémentaires dans les noyaux des cellules hépatiques, lésions caractéristiques pour Nicolau et Ruge (5) et pour Pélissier et Lumaret (6). Une dégénérescence graisseuse du foie, avec clarification des cellules hépatiques et pigments noirs et ocre dans les cellules de Kupffer ; mais ces lésions ont été signalées sur cobayes, lapins ou souris et non sur embryon de poulet.

Celles que nous avons constatées sur les embryons de poulet, bien que différentes, nous semblent montrer que le virus peut se transmettre par passages successifs de foies d'embryons sans entraîner la mort de ces derniers. La constatation de ces altérations histologiques du foie retrouvées par passages successifs ne permet pas de conclure à leur spécificité ni à leur constance dans des cas analogues, puisque c'est à partir du liquide duodénal d'un seul malade que l'expérience a été pratiquée. Nous nous proposons ultérieurement de tenter l'isolement du virus chez d'autres malades, afin de voir si les lésions de même type sont constatées.

(Laboratoire de la Clinique des Maladies infectieuses et Bactériologie.
Faculté de Médecine, Lyon [Professeur P. SÉDALLIAN].)

(5) S. NICOLAU et H. RUGE, *Arch. ges. Virusf.*, 1944, n° 5, 260.

(6) PÉLISSIER et LUMARET, *Bull. Soc. Path. exot.*, 1949, 49, 52. — PÉLISSIER, *ibid.*, 197.

UTILISATION D'UN MILIEU DE CHAPMAN MODIFIÉ POUR LA DÉTERMINATION DE LA CONTAMINATION DE L'AIR PAR LES STAPHYLOCOQUES

par M. CARRAZ et A. BERTOYE.

Au cours de l'étude du cycle des staphylocoques pathogènes pénicillino-résistants chez les nourrissons, étude qui fera l'objet de notes ultérieures, nous avons utilisé un milieu de Chapman légèrement modifié en vue de déterminer la contamination de l'air. Cette méthode nous a permis d'isoler plus facilement les staphylocoques pathogènes pouvant fermenter le mannitol.

C'est à la suite des travaux de Koch (1) sur la croissance du staphylocoque en présence de fortes concentrations en chlorure de sodium que Chapman (2) mit au point une technique d'enrichissement et d'isolement de ces germes. Il utilisa en particulier une gélose chlorurée et mannitée. Ces techniques furent mises à profit par de nombreux auteurs. Buttiaux et Brogniard (3), Buttiaux et Pierret (4) les utilisent pour la détection des staphylocoques pathogènes dans les selles, surtout chez le nourrisson. R. Kourilsky, Mercier et Pillet (5) préconisent l'isolement des staphylocoques sur le milieu mannité électif de Chapman et donnent comme test de pathogénicité la fermentation du mannitol.

Dans nos expériences, nous avons utilisé un milieu qui diffère du milieu primitif de Chapman par sa concentration plus importante en rouge de phénol, par l'emploi de peptone pancréatique de caséine au lieu de protéose peptone Difco n° 3 et de bouillon au placenta au lieu d'extrait de viande Difco. Il répond à la formule suivante :

Peptone pancréatique de caséine	20 g.
NaCl	75 g.
Mannitol	10 g.
Gélose	15 g.
Solution de rouge de phénol	25 cm ³
Bouillon au placenta	Q.S.P. 4.000 g.

La solution de rouge de phénol est préparée avec :

Rouge de phénol	0,10 g.
Solution de soude N/20	5,7 cm ³
Eau	Q.S.P. 35 cm ³

Après dissolution à chaud des différents produits dans le bouillon,

- (1) KOCH, *Zentralbl. Bakt. I.*, 1942, **149**, 122.
- (2) G. H. CHAPMAN, *J. Bact.*, 1937, **33**, 533 et 646 ; 1938, **35**, 111 ; 1945, **50**, 261 ; 1946, **51**, 405 et 409 ; *Food Research*, 1937, **2**, 349.
- (3) R. BUTTIAUX et R. BROGNIARD, *Ces Annales*, 1947, **73**, 830.
- (4) R. BUTTIAUX et J. PIERRET, *Ces Annales*, 1949, **76**, 482.
- (5) R. KOURILSKY, MERCIER et J. MILLET, *Ann. Biol. clinique*, 1949, nos 5-6, 173.

le milieu est amené à pH 7,4 et stérilisé à 110° pendant vingt minutes. Au moment de l'emploi, il est coulé en boîtes de Petri qui sont séchées par un séjour de vingt-quatre heures à l'étuve à 37° avant exposition à l'air.

Avec un tel milieu, une concentration élevée en rouge de phénol nous permet de déceler plus facilement les colonies de staphylocoques fermentant le mannitol, qui sont entourées d'une auréole jaune. Par comparaison avec un milieu contenant la même proportion de rouge de phénol que le milieu de Chapman, nous avons vérifié que la forte concentration de rouge de phénol de notre milieu n'inhibe en rien la pousse de diverses souches de staphylocoques, pathogènes ou non.

Pour la détermination de la contamination de l'air, nous avons opéré de la façon suivante :

Deux séries de boîtes de Petri rigoureusement identiques, de 95 mm. de diamètre, les unes contenant le milieu de Chapman modifié, les autres un milieu gélose ordinaire (milieu de Chapman modifié ne comportant ni mannitol, ni chlorure de sodium, ni rouge de phénol), étaient exposées à l'air côte à côte pendant le même temps (cinq minutes) dans une salle de changes de nourrissons. Après séjour de quarante-huit heures à l'étuve à 37°, les colonies microbiennes de chaque boîte étaient comptées au moyen d'un quadrillage. Toutes les colonies se développant sur milieu de Chapman modifié étaient identifiées microscopiquement.

Nous avons constaté, par comparaison avec nos boîtes de gélose ordinaire, que les staphylocoques poussent électivement sur milieu de Chapman modifié. Malgré le grand nombre de déterminations sur ce milieu, nous n'avons jamais découvert de moisissures qui, par contre, poussaient abondamment sur gélose ordinaire. Pour les bactéries, une seule fois nous avons constaté la présence d'un germe du genre *Bacillus* faisant fermenter le mannitol et trois fois la présence d'un coliforme.

Presque toutes les colonies de staphylocoques étaient pigmentées en orange. Nous avons pu vérifier que cette pigmentation, due sans doute à une absorption de colorant, ne se reproduisait pas dans tous les cas, après plusieurs repiquages sur gélose ordinaire ou sérum coagulé.

Nous avons pu numérer facilement :

Les colonies se développant sur gélose ordinaire ;

Les colonies de staphylocoques et les colonies de staphylocoques virant le mannitol se développant en milieu de Chapman modifié.

Nous avons pu en déduire :

La contamination de l'air en bactéries se développant sur gélose ordinaire ;

La contamination de l'air en staphylocoques et en staphylocoques virant le mannitol ;

Les pourcentages de staphylocoques et de staphylocoques virant le mannitol par rapport à la contamination de l'air en bactéries ;

Le pourcentage de staphylocoques virant le mannitol par rapport à la contamination de l'air en staphylocoques.

Ces pourcentages sont particulièrement intéressants à étudier et feront l'objet d'un mémoire à paraître ultérieurement. D'après ces résultats, nous pouvons déjà signaler la persistance de staphylocoques dans l'air des salles de changes de nourrissons malgré les variations de

la contamination globale de l'air au cours d'une même journée, la fixité remarquable du rapport contamination de l'air en staphylocoques virant le mannitol sur contamination globale de l'air en staphylocoques.

(Chaire de Bactériologie et Clinique des Maladies infectieuses
de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Lyon.)

Les communications suivantes paraîtront en *Mémoire* dans les *Annales de l'Institut Pasteur* :

Action « in vitro » de la pénicilline, de la streptomycine, de l'auréomycine et de la chloromycétine sur les virus du groupe lymphogranulomatose-psittacose, par G. BARSKI et J. MAURIN.

Hémolysine oxydable de « Cl. bifermentans », par M^{lle} M. GUILLAUMIE, A. PESCE DE FAGONDE et A. KREGUER.

La toxine de « Pasteurella pseudotuberculosis ». Ses analogies avec la toxine de « *Past. pestis* » (A propos d'un Mémoire de A. S. Lazarus et M. M. Nozawa), par G. GIRARD.

ERRATUM

N° de Mars 1950, p. 429.

Lignes 12 et 17.

Au lieu de : extrait glucido-lipidique.

Lire : extrait glucido-lipido-polypeptidique.

Le Gérant : G. MASSON.

SOCIÉTÉ FRANÇAISE DE MICROBIOLOGIE

ASSOCIATION DES MICROBIOLOGISTES DE LANGUE FRANÇAISE

(Institut Pasteur, 25, rue du Docteur-Roux, Paris, 15^e.)

EXTRAIT DES STATUTS :

Article premier. — L'association dite Association des Microbiologistes de Langue Française, fondée en 1937, à Paris, a pour but de grouper les Microbiologistes de langue française et de créer entre eux un lien. Elle a son siège à Paris.

L'association se compose de membres nationaux et de membres étrangers de toutes langues.

La langue française est la langue officielle des Congrès de l'Association et celle de la publication de ses travaux.

Art. 2. — L'A. M. L. F. est instituée uniquement pour l'étude et la discussion en commun de toutes les disciplines relevant de la science microbiologique.

Art. 3. — Les membres nationaux de l'A. M. L. F., ainsi que les membres étrangers résidant habituellement en France constituent la Section française de l'A. M. L. F. ou SOCIÉTÉ FRANÇAISE DE MICROBIOLOGIE. La Section française de l'A. M. L. F. reçoit dans l'intervalle des Congrès une délégation permanente du Conseil de l'A. M. L. F. Son activité est régie par un règlement intérieur, approuvé par l'Assemblée Générale.

Art. 4. — La Section française de l'A. M. L. F. ou SOCIÉTÉ FRANÇAISE DE MICROBIOLOGIE, constitue de plein droit la Section française de l'Association internationale de Microbiologie.

Art. 5. — Peut faire partie de l'Association toute personne remplissant une fonction scientifique dans un laboratoire de microbiologie (microbiologie pure ou appliquée, bactériologie, pathologie infectieuse, immunologie, sérologie, chimiothérapie, cancérologie), ou ayant publié des travaux scientifiques de microbiologie.

Art. 23. — *Publications* — Les publications des travaux exposés dans les séances mensuelles se font dans les conditions et selon les modalités décidées par le Bureau de la Section française.

Le Bureau peut refuser de publier tout travail ou communication, qui ne serait pas conforme aux buts de l'association ou au caractère de ses publications. Ses décisions sont sans recours.

Art. 27. — Les auteurs des communications et démonstrations devront être membres de l'Association. Les étrangers à l'Association ne seront acceptés comme auteurs que s'ils ont pour co-signataire un membre de l'Association, ou s'ils ont été invités par le Bureau à faire une communication, ou si un membre de l'Association ayant assisté aux recherches rapportées se charge de discuter le travail en séance.

En dehors des Congrès, dont la périodicité et la date sont fixées par l'Assemblée Générale sur la proposition du Bureau, l'Association se réunit en séances consacrées à des communications scientifiques, le premier jeudi de chaque mois (août et septembre exceptés), à 16 heures. Les séances ont lieu au Grand Amphithéâtre de l'Institut Pasteur ; elles sont publiques.

Les membres désirant présenter des communications sont priés d'en aviser le Secrétaire général, et de lui en communiquer le titre, pour permettre l'établissement de l'ordre du jour de la réunion.

Le texte des communications doit être remis à la séance, établi en variété, en exemplaire dactylographié original. La bibliographie

des auteurs cités sera établie, conformément aux règles admises par l'Association Internationale de Microbiologie, dans l'ordre suivant : nom de l'auteur, titre du périodique (en abrégé et en italiques), année de publication, tome (en chiffres arabes gras), page. Les signes t., p., etc., sont supprimés. Les abréviations des noms de périodiques courants figurent sur une liste qui sera adressée aux auteurs, sur leur demande. Les figures illustrant le texte doivent être remises avec leurs clichés typographiques, sinon il pourra en résulter des délais de publication. La Rédaction se charge, le cas échéant, de faire faire tous les dessins, graphiques, tracés, et de faire cliquer, aux frais des auteurs, tous les documents qui lui seront adressés à temps, soit huit jours au moins avant la séance, pour parution dans le numéro suivant des *Annales de l'Institut Pasteur*.

En raison des restrictions apportées aux publications par les circonstances actuelles, le texte de chaque communication ne pourra occuper plus de deux pages de l'emplacement réservé dans les *Annales de l'Institut Pasteur*, soit environ 1.200 mots. Les références bibliographiques et les clichés, s'il y en a, seront compris dans cet espace. Toute communication dépassant ce maximum sera retournée à son auteur, ou devra avoir été préalablement acceptée par la Rédaction des *Annales de l'Institut Pasteur*, pour y paraître en Mémoire.

Le Secrétaire général : P. LÉPINE.

Séance du 2 Mars 1950.

SOMMAIRE	Pages.
Présentation d'ouvrage	664
Livre reçu	665
Communications :	
Adaptation de la méthode des tubes roulants à la technique de culture de tissus sur membranes plastiques, par GEORGES BARSKI	666
Recherches sur la physiologie des <i>Azotobacter</i> en association avec certains germes oligonitrophiles du sol, par J. KAUFFMANN	670
Essai d'abaissement <i>in vitro</i> de la résistance de certains staphylocoques aux antibiotiques, par R. FASQUELLE et P. BARBIER	674
Action de la streptomycine et du para-amino-salicylate de soude (P.A.S.), dans la tuberculose expérimentale du cobaye, par R. MARAL et A. BLANDIN	677
Étude <i>in vitro</i> de l'action du para-amino-salicylate de sodium (P.A.S.) 1° Sur la sensibilité des souches de B.K. à la streptomycine. 2° Sur le pouvoir bactériostatique de la streptomycine, par R. MARAL et A. BLANDIN	681
Utilisation pratique d'un posemètre en photomicrographie, par P. MANIGAULT et Y. T. TCHAN	684
Étude du potentiel d'oxydo-réduction de la gélose profonde, par M. MOUREAU	686
Mutation <i>in vitro</i> chez un <i>Paracolobactrum</i> , par R. BUTIAUX et A. KESTELOOT	691
Sur un <i>Flavobacterium fecale</i> isolé d'une hémoculture, par P. SÉDALLIAN, M. CARRAZ et R. MARAL	694
Absence de pouvoir pathogène, pour le singe, des anaérobies du genre <i>Actinobacterium</i> , par E.-R. BRYGOO	696
Isolement d' <i>Hemophilus pertussis</i> sur le milieu additionné de suc allantoidien d'œuf de poule incubé, par ANDRÉ BERTOYE	698
Étude d'une souche de virus d'hépatite épidémique. Lésions histologiques du foie d'embryon de poulet, par ANDRÉ BERTOYE et RENÉ BRETTE	700
Utilisation d'un milieu de Chapman modifié pour la détermination de la contamination de l'air par les staphylocoques, par M. CARRAZ et A. BERTOYE	702